

Charakterisierung und Lokalisation der
PIP₂-Phospholipase C
aus Skelettmuskeltriaden des Kaninchens

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Michael Messer
aus Duisburg

1988



Charakteristiken und Institutionen der
1970er Jahre
und die Entwicklung der Institutionen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546619_0043

**Charakterisierung und Lokalisation der
PIP₂-Phospholipase C
aus Skelettmuskeltriaden des Kaninchens**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Michael Messer
aus Duisburg

1988

1. Gutachter: Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer, Jr.
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Hengstenberg

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich:

Herrn Prof. Dr. L. M. G. Heilmeyer, Jr., der mir das Thema und den Arbeitsplatz zur Verfügung stellte und jederzeit zu einer Diskussion über fachliche oder technische Belange bereit war.

Herrn Prof. Dr. W. Hengstenberg für die Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. M. Varsanyi für die gute Betreuung und die Hilfsbereitschaft bei allen Problemen.

Herrn Prof. Dr. N. R. Brandt, der sehr wertvolle Präparationstechniken etablierte und dessen Erfahrungen eine große Hilfe waren.

Herrn Dr. R. Thielezcek, der die verwendeten Basicprogramme entwickelte und bei Computer-spezifischen Problemen mit Rat und Tat hilfreich war.

Herrn Herrn U. Siemen für die gute Kooperation bei allen angenehmen und unangenehmen Teilen der Präparationen und die Hilfe in allen technischen Fragen.

Herrn Dr. P. Schadewaldt und Herrn N. J. Stapper für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Ins-1-Phosphat Akkumulation im EDL.

Frau M. Cochu, Frau P. Goldmann und Frau M. Preiß, die ihren Anteil an dem guten Arbeitsklima haben und immer bereit waren, größere und kleinere Hilfen zu leisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise in folgenden Zeitschriften veröffentlicht worden:

- VARSANYI, M.; MESSER, M.; BRANDT, N.R. and HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1986): Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 1395-1404
- VARSANYI, M.; MESSER, M. and BRANDT, N.R. (1988): Eur. J. Biochem. zur Veröffentlichung eingereicht.

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bq	Becquerel, Zerfälle pro Sekunde (10^{12} Bq = 27 Ci)
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	3',5'-cyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie (1 Ci = $2,22 \times 10^{12}$ dpm = 37×10^9 Bq)
DG	Diacylglycerol
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -Aminoethylenether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
HEPES	N-2-Hydroxy-ethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K _m	Michaelis-Menten Konstante
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	PIP ₂ -Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
PS	Phosphatidylserin
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Material und Methoden</u>	12
2.1.	Präparative Methoden	12
2.1.1.	Isolierung von Skelettmuskeltriaden	12
2.1.2.	Trennung der Triaden in terminale cisternae und T-tubuli in einer Druckzelle	13
2.1.3.	Isolierung von Herzmuskelfmembranen aus Kaninchenventrikeln	14
2.1.4.	Darstellung von γ - ^{32}P -ATP	14
2.2.	Analytische Methoden	16
2.2.1.	Bestimmung der PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität	16
2.2.2.	Bindungsstudie mit dem Liganden Quinuclidinyl Benzilate, L-(Benzilic-4,4- ^3H)	17
2.2.3.	Bindungsstudie mit dem Liganden PN 200-110, (+)-(5-Methyl- ^3H)	17
2.2.4.	Markierung der T-tubuli mit ^3H -Ouabain	18
2.2.5.	Lipidphosphorylierung	18
2.2.6.	Extrahierung der sauren Lipide nach Schacht	19
2.2.7.	Identifizierung der phosphorylierten Lipide	19
2.2.8.	Bestimmung der Inositol-1-Phosphat Akkumulation im M. extensor digitorum longus des Kaninchens	20
2.2.9.	Lipidextrahierung nach Bligh und Dyer	20
2.2.10.	Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Akkumulation im Myoplasma	21
2.2.11.	Proteinbestimmung	21
2.2.12.	Bestimmung der Saccharose-Konzentration	22
2.2.13.	Messung der Radioaktivität	22
2.2.14.	Berechnung der freien Ionen-Konzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} in Gegenwart von Komplex- bildnern	23

3.	<u>Ergebnisse</u>	24
3.1.	Charakterisierung der PIP_2 -Phospholipase C	24
3.1.1.	pH-Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C	24
3.1.2.	Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C von der freien Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration	26
3.1.3.	Hemmung der PIP_2 -Phospholipase C durch Mg^{2+}	28
3.1.4.	Einfluß von Saccharose und Triton X-100 auf die PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität	29
3.1.5.	Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C von der PIP_2 -Konzentration	31
3.2.	Lokalisation der PIP_2 -Phospholipase C in den Skelettmuskelmembranen	31
3.2.1.	Intrazelluläre Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C zwischen Triaden und longitudinalem SR	31
3.2.2.	Intrazelluläre Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C zwischen T-tubuli und terminalen cisternae	35
3.2.3.	Lokalisation der PIP_2 -Phospholipase C in den T-tubuli	37
3.2.4.	Vergleich der in den Skelettmuskelmembranen gemessenen PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität mit anderen Geweben	39
3.3.	Versuche zur Regulation der PIP_2 -Phospholipase C	40
3.3.1.	PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität mit und ohne GTP γ S	40
3.3.2.	Einfluß von α - und β -Agonisten auf die PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität	42
3.3.3.	Einfluß von Adrenalin und Vasopressin auf die Inositol-1-Phosphat Akkumulation im M. extensor digitorum longus des Kaninchens	43
3.4.	Berechnungen zur potentiellen PIP_2 -Hydrolyse der Phospholipase C	45
3.4.1.	Konzentration von PI, PIP und PIP_2 in den T-tubuli	45
3.4.2.	Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Akkumulation während einer einzelnen Muskelkontraktion	47

3.4.3.	Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Akkumulation im Myoplasma eines schnellen Muskels während eines Tetanus	52
3.4.4.	Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Produktion während eines Aktionspotentials	53
3.4.5.	Zeitdauer bis zum Erreichen einer Inositol- 1,4,5-trisphosphat Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ im Spalt zwischen den Membranen der Triaden	56
3.5.	Aktivitäten der PI-metabolisierenden Enzyme in den T-tubuli	57
3.5.1.	Aktivität der PI-Kinase und PIP-Kinase in den T-tubuli	58
3.5.2.	PIP- und PIP_2 Nachbildung während eines Ca^{2+} -Transienten einer Einzelkontraktion	60
3.5.3.	Vergleich der Enzymaktivitäten in den Skelettmuskel-T-tubuli mit anderen Systemen	61
3.6.	Vergleich der Lipidphosphorylierung in Plasmamembranen aus Kaninchenventrikeln mit Skelettmuskel-T-tubuli	63
3.6.1.	Auftrennung von Herzmuskelmikrosomen in Dyaden und freie Plasmamembranen	63
3.6.2.	Phosphorylierung der Phosphoinositide in den Herzmuskelmembranen nach Inkubation mit ATP/Mg^{2+}	65
4.	<u>Diskussion</u>	67
5.	<u>Zusammenfassung</u>	75
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	76



1. EINLEITUNG

Der quergestreifte Muskel ist aus Muskelzellen aufgebaut, die von einem Sarkolemma umgeben sind. Jede Muskelzelle enthält parallel angeordnete Myofibrillen im Myoplasma. Diese bestehen aus den dicken Filamenten (hauptsächlich Myosin) und den dünnen Filamenten (Aktin, Tropomyosin und Troponin). Die Myofibrillen zeigen in ihrer Längsrichtung ein charakteristisches Muster. Dieses Muster entsteht durch die Abwechslung von A-Banden (A=anisotrop) und I-Banden (I=isotrop). Die I-Bande ist durch eine Z-Scheibe geteilt. Den Bereich zwischen zwei Z-Scheiben bezeichnet man als Sarkomer. Jedes Sarkomer ist von einem Membransystem umgeben, dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Außerdem gibt es noch ein zweites Membransystem: das Transvers-System (T-System oder T-tubuli). Die T-tubuli verlaufen senkrecht zur Längsachse der Myofibrillen. Sie sind eine Einstülpung des Sarkolemmas. Der Auslöser für eine Muskelkontraktion ist die Depolarisation des Sarkolemmas, das Aktionspotential (Dauer: ca. 2 ms). Diese Erregung der Membran wird entlang der T-tubuli ins Innere der Zelle fortgeleitet (1;2;3). In der Folge steigt die Ca^{2+} -Konzentration des Myoplasmas von 60 nM im Ruhezustand (4) auf 1-7 μM durch Freisetzung des im SR gespeicherten Ca^{2+} . Die Dauer dieses Ca^{2+} -Transienten beträgt ca. 50 ms für eine einzelne schnelle Muskelkontraktion (z.B. Skelettmuskel) und 800 ms für eine langsame Muskelkontraktion (z.B. Herzmuskel). Erst die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ermöglicht die Kontraktion. Die Ca^{2+} -Ionen binden an Troponin C, die Ca^{2+} -bindende Untereinheit des Troponinkomplexes und bewirken dort eine Konformationsänderung, die auch Tropomyosin und Aktin erfaßt. Als Folge davon können Aktin und Myosin miteinander reagieren und unter Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse aneinander vorbeigleiten (engl.: sliding-filament-theory). Nach dem Abklingen der Erregung werden die Ca^{2+} -Ionen aktiv von der Ca^{2+} -Transport-ATPase ins SR zurücktransportiert.

Die Kontaktstellen zwischen T-tubuli und SR nennt man Triaden. Man versteht darunter eine Struktur, die aus Plasmamembran (T-tubuli) und den beiden benachbarten terminalen cisternae besteht. Terminale cisternae sind Ausbuchtungen des SRs, die durch das sogenannte longitudinale SR miteinander verbunden sind. Die Membranen der Triaden sind

durch einen 10-20 nm breiten Spalt getrennt (engl.: junctional gap), der von sogenannten Füßchen (engl.: junctional feet) überbrückt wird.

Es ist bekannt, daß Ca^{2+} hauptsächlich aus den terminalen cisternae freigesetzt wird (5;6). Bindungsstudien mit dem Alkaloid Ryanodin, das selektiv an den Ca^{2+} -freisetzenden Kanal bindet, haben gezeigt, daß Ryanodinrezeptor, Ca^{2+} -Kanal und Füßchenstruktur eine Einheit bilden (7;8).

Die Ereignisse zwischen dem Aktionspotential und der Muskelkontraktion nennt man elektromechanische Kopplung. Es ist zur Zeit noch nicht geklärt, welcher Mechanismus durch die Depolarisation der T-tubuli aktiviert wird, so daß es zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR kommt. Man diskutiert verschiedene Theorien (zur Übersicht siehe 9):

- Die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Dabei wird während eines Aktionspotentials Ca^{2+} in den Spaltraum zwischen terminalen cisternae und T-tubuli freigesetzt, welches an den terminalen cisternae zur Ca^{2+} -Freisetzung führt (10;11;12).
- Die Depolarisation-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Man nimmt an, daß das Aktionspotential der T-tubuli zu einer Depolarisation des SRs führt. Als Folge davon wird die Ca^{2+} -Permeabilität des SR erhöht, und Ca^{2+} freigesetzt (13;14;15;16).
- Die durch Ladungsänderung induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Als Folge der Depolarisation der T-tubuli wird ein Aktivator freigesetzt (17) oder ein Makromolekül in der Füßchenstruktur bewegt (18;19). Beide Vorgänge führen zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR.
- In neuerer Zeit diskutiert man noch eine andere Theorie, bei der Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) als chemischer Transmitter der elektromechanischen Kopplung beteiligt sein soll. Auf diese Hypothese wird weiter unter noch eingegangen.

Die Funktion einer eukaryotischen Zelle wird durch Neurotransmitter, Hormone und einer großen Anzahl von Wachstumsfaktoren reguliert. Die interzellulären Signalmoleküle binden an spezifische Rezeptoren der Oberflächenmembran. In der Folge kommt es zur Bildung von sekundären Botenstoffen (engl.: second messenger), die eine Antwort der Zelle bewirken. Diesen Vorgang nennt man Signaltransduktion.

Man kennt verschiedene Mechanismen der Signaltransduktion.

Ein Mechanismus ist die Aktivierung eines Rezeptors, dessen integraler Bestandteil ein Ionenkanal ist (z.B. der nikotinerge Acetylcholinrezeptor) (20). Durch die Bindung des Agonisten verändert sich die Leitfähigkeit des Kanals und es kommt zu einem Ionen-Flux, der die Polarität der Membran verändern kann.

Andere Rezeptoren wirken nach der Bindung des Agonisten auf die Adenylat Cyclase ein, so daß die Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle verändert wird (21;22). Dabei wird nach Bindung eines Agonisten an einen adrenergen β -Rezeptor ein Komplex mit einem hemmenden (G_i) oder stimulierenden (G_s) Guaninnukleotid bindendem Protein (G-Protein) gebildet. Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten: α , β und γ . Im Basalzustand ist GDP an die α -Untereinheit gebunden. Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor erlaubt einen Austausch von GDP gegen GTP und es kommt zu einer Dissoziation der Untereinheiten. Der freie α -GTP Komplex wirkt regulierend auf die Adenylat Cyclase ein.

Eine dritte Variante der Signaltransduktion wurde vor mehr als dreißig Jahren entdeckt. Hokin and Hokin, 1953 (23) konnten nachweisen, daß die cholinerge Stimulation der Bauchspeicheldrüse zu einem erhöhten Phosphatidylinositol (PI)-Umsatz führt. Inzwischen wurden eine große Anzahl von Stimuli in den unterschiedlichsten Geweben entdeckt, die auf den PI-Stoffwechsel wirken. Michell zeigte 1975 als Erster, daß Rezeptoren, deren Aktivierung zu einem erhöhten PI-Umsatz führt, zugleich eine Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung haben (24). Die Anzahl der Rezeptoren, deren Aktivierung zu einem erhöhten PI-Umsatz führen ist groß (einen Überblick bieten 25 und 26). In den meisten Geweben handelt es sich um α_1 Rezeptoren, z.B. beim Ratten-Papillarmuskel (27) und Ratten-Skelettmuskel (28), bei Hamster-Adipozyten (29) und Cerebral-Cortex (30) oder um muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (M1 oder M2) bei Ratten-Mukosazellen (31) glatter Muskulatur (32) und Herzmuskel (33).

Einen Überblick über die heutige Vorstellung des PI-Stoffwechsels in Nichtmuskelzellen und glatter Muskulatur zeigt Abb 1.

sammenfassend werden PI, PIP und PIP_2 Phosphoinositide genannt. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor induziert die Hydrolyse des PIP_2 durch eine phosphoinositid-spezifische Phosphodiesterase (PIP_2 -Phospholipase C). Es wird allgemein angenommen, daß diese Reaktionen nur in der Plasmamembran ablaufen. In die Aktivierung der PIP_2 -Phospholipase C ist ein G-Protein involviert. Als Produkte der PIP_2 -Spaltung entstehen die beiden sekundären Botenstoffe 1,2-diacylglycerol (DG) und Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3). Das DG bleibt in der Membran und aktiviert die Protein Kinase C, ein Enzym, das eine große Zahl von Proteinen in der Zelle phosphoryliert (34;35). DG bewirkt eine Erhöhung der Ca^{2+} -Affinität der Protein Kinase C sowie eine Translokation des cytosolischen Enzyms an die Membran (36).

Der Abbau des DG kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen führt er, durch von Lipasen katalysierter Hydrolyse, zu den Produkten Stearat, Glycerol und Arachidonat. Arachidonat ist dabei von besonderer Bedeutung, da es zur Synthese der Icosanoide Prostaglandin, Thromboxan und Leukotrien benötigt wird. Alternativ dazu kann DG durch eine DG-Kinase zu Phosphatidsäure (PA) phosphoryliert werden. In einer Cytidintriphosphat-abhängigen Synthese entsteht daraus über Cytidindiphosphatdiacylglycerin PI.

Im Gegensatz zum DG wird IP_3 ins Cytosol abgegeben. Es konnte gezeigt werden, daß IP_3 die Ca^{2+} -Freisetzung aus nichtmitochondrialen intrazellulären Speichern induziert (37;38). Bei dem Calciumspeicher handelt es sich in erster Linie um das endoplasmatische Reticulum (ER) (39). Als IP_3 -sensitiver Ca^{2+} -Speicher in einigen Nicht-Muskelzellen (HL-60 und PC 12 Zellen, Rattenleber) werden auch spezielle Strukturen, die sogenannten Calciosomen diskutiert (40). Inzwischen ist es gelungen, IP_3 -bindende Rezeptoren nachzuweisen und zu charakterisieren (41;42).

Das freigesetzte Ca^{2+} kann alle Ca^{2+} -abhängigen Prozesse in der Zelle regulieren. Neben der Regulation der Kontraktion in Muskelzellen ist die Aktivierung von Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Enzymen, wie z.B. der Phosphorylase Kinase, Protein Kinase C, der Ca^{2+} -abhängigen Phosphatase (Calcineurin) und der IP_3 -Kinase (43) von besonderer Bedeutung. Ca^{2+} wird deshalb auch als "third messenger" bezeichnet.

Katalysiert durch spezielle Kinasen können aus IP_3 höher phosphorylierte Inositolphosphate entstehen, deren Funktion in der Zelle nicht in

allen Fällen geklärt ist. Es konnte aber z.B. gezeigt werden, daß Inositol-1,3,4,5-Phosphat zusammen mit IP_3 auf die Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran einwirken kann (44;45). Das in Truthahn-Erythrozyten vorkommende Inositol-1,3,4,5,6-Phosphat ist als allosterischer Regulator des Hämoglobins im Truthahn-Blut von Bedeutung (46). Die bisher bekannten Inositol-Phosphate sind in (25) zusammengestellt.

Der Katabolismus von IP_3 besteht in einer schrittweisen Dephosphorylierung zu Inosit, der Vorstufe des PI. Die jeweilige Reaktion wird von spezifischen Phosphomonoesterasen katalysiert (47).

Im Gegensatz zu den Nicht-Muskelzellen ist über den PI-Stoffwechsel in der Skelettmuskelzelle nicht sehr viel bekannt.

Die PI-Kinase Aktivität ist in den Triaden des Kaninchen-Skelettmuskels nachgewiesen worden. Nach der Trennung der Membranfraktionen in T-tubuli und terminale cisternae konnte das Enzym in beiden Membranen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung des PI in den T-tubuli führt zur Entstehung von PIP, PIP_2 und PA. Daraus läßt sich auch auf das Vorhandensein einer PIP-Kinase, einer PIP_2 -Phospholipase C und einer DG-Kinase schließen (48).

Anders als bei dem PI-Stoffwechsel in Nicht-Muskelzellen ist die Metabolisierung des PI im Skelettmuskel nicht auf die Plasmamembran beschränkt. Durch Untersuchungen am Kaninchen-Skelettmuskel ist bekannt, daß nach Inkubation mit ATP/Mg^{2+} im longitudinalen SR und an der isolierten Ca^{2+} -Transport ATPase PI durch die PI-Kinase zu PIP phosphoryliert wird. Eine weitere Phosphorylierung zu PIP_2 findet nicht statt. Das entstandene PIP wirkt stimulierend auf die Ca^{2+} -Transport ATPase Aktivität (49).

PI- und PIP-Kinase Aktivitäten sind nicht nur im Kaninchen-Skelettmuskel, sondern auch in den T-tubuli aus Froschmuskulatur nachgewiesen worden (39).

Die vorrangige Bedeutung des IP_3 in der Skelettmuskelzelle ist umstritten. Die im Falle der Nicht-Muskelzellen und der glatten Muskulatur beschrieben IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung wird bei der quergestreiften Muskulatur kontrovers diskutiert. Volpe et al., 1985 (50) zeigten eine durch IP_3 hervorgerufene Ca^{2+} -Freisetzung aus isolierten SR Vesikeln. Vergara et al., 1985 (51) berichten außerdem über eine IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung in enthäuteten Skelettmuskelfasern. Demgegenüber kommen andere Arbeitsgruppen zu einem gegenteiligen Ergebnis:

IP_3 kann keine Ca^{2+} -Freisetzung aus SR Vesikeln bewirken (52) bzw. IP_3 führt nicht zur Ca^{2+} -Freisetzung in enthäuteten Muskelfasern (53). Die Ursache für die abweichenden Ergebnisse ist möglicherweise durch die unterschiedliche Polarisation der verwendeten T-tubuli Membran bedingt. Neue Untersuchungen zeigen, daß das Membranpotential der T-tubuli die IP_3 -Sensitivität kontrolliert und damit auch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (54).

Die Bedeutung des IP_3 geht möglicherweise über die Ca^{2+} -Freisetzung hinaus. Thieleczek und Heilmeyer, 1986 (55) konnten zeigen, daß IP_3 in enthäuteten Muskelfasern die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates reversibel erhöht. Das heißt, IP_3 führt zu einer Erhöhung der submaximalen isometrischen Kraft des Muskels während des Fließgleichgewichts (engl.: steady state).

Kürzlich haben Thieleczek et al., 1988 (56) gezeigt, daß IP_3 auch einen Einfluß auf die Kompartimentierung der Aldolase, einem Enzym der Glykolyse, im Kaninchenskelettmuskel hat. Die Gegenwart von IP_3 führt zu einer Freisetzung des membrangebundenen Enzyms. Es ist noch ungeklärt, welche physiologische Bedeutung die freigesetzte Aldolase im Myoplasma erfüllt.

In jüngster Zeit wird IP_3 erneut als chemischer Transmitter bei der elektromechanischen Kopplung sowohl im Herzmuskel (57), als auch im Skelettmuskel (51) diskutiert. Nach der Hypothese von Vergara et al., 1985 (51) und Vergara und Asotra, 1987 (58) wird durch die Depolarisation der T-tubuli Membran eine PIP_2 -Phospholipase C aktiviert. Als Folge davon kommt es verstärkt zur Entstehung von DG und IP_3 . Nach der Diffusion durch den Spalt zwischen T-tubuli und terminale cisternae bindet das IP_3 an die hypothetischen IP_3 -Rezeptoren und setzt Ca^{2+} aus dem SR frei. Die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese steht bisher noch aus.

Die unterschiedlichen Funktionen des IP_3 deuten darauf hin, daß der sekundäre Botenstoff IP_3 im Muskel scheinbar eine pleiotrope Wirkung hat.

Eine PIP_2 -Phospholipase C aus Skelettmuskulatur ist bisher noch nicht beschrieben worden. Im Zusammenhang mit Experimenten zur IP_3 -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wird vermutet, daß die PIP_2 -Phospholipase C im Skelettmuskel ähnlich wie in anderen Geweben einer Regulation durch ein G-Protein unterliegt (59).

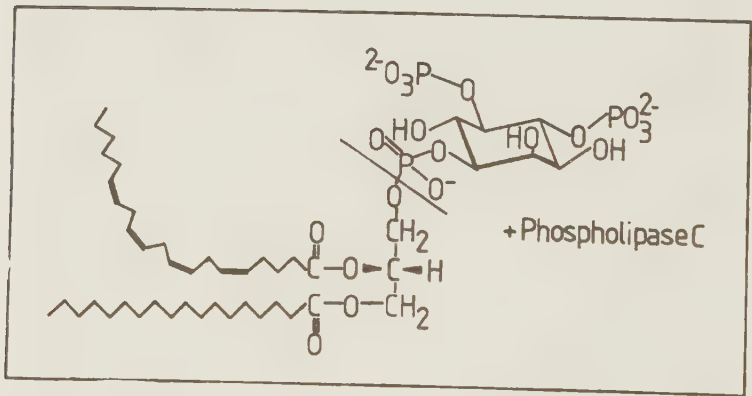


Abb. 2: Spaltung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat katalysiert von der PIP_2 -Phospholipase C. Bei der Bestimmung der Enzymaktivität (siehe 2.2.1.) wird Substrat verwendet, daß am C_2 -Atom ^3H -Wasserstoff markiert ist. Als Folge einer Spaltung des PIP_2 entsteht dann ^3H -Wasserstoff markiertes IP_3 , das durch die Bestimmung der Radioaktivität (siehe 2.2.13.) quantifiziert werden kann.

Bei dem in Abb. 2 dargestellten enzymatischen Mechanismus der Spaltung der Phosphodiesterbindung handelt es sich um eine Hydrolyse. Zur Komplettierung der Reaktion wird entweder ein Hydroxylion des Wassers verwendet, oder die Hydroxylgruppe an der 2-Position des Inositol Ringes involviert. Deshalb kann neben IP_3 auch noch cyclisches IP_3 entstehen, das auch als sekundärer Botenstoff agiert, und z.B. bei der Stimulierung des Photorezeptors bei *Limulus* effektiver ist als IP_3 (60). Die PIP_2 -Phospholipase C ist in vielen Säugetiergeweben vorhanden. Nach Rhy et al., 1987 (61) gibt es in den Geweben mindestens fünf verschiedene PIP_2 -Phospholipase C-Isoenzyme. Zunächst gibt es ein 150 kD Protein, das hauptsächlich in Gehirnzellen vorkommt. Dann das 145 kD Enzym, das in verschiedenen Geweben verbreitet ist. Außerdem die 85 kD PIP_2 -Phospholipase C aus dem Gehirn und Samenbläschen-Vesikeln sowie ein 65 kD Protein aus Leber und Blutplättchen. Schließlich gibt es noch eine nicht näher charakterisierte 140 kD PIP_2 -Phospholipase C.

Man unterscheidet eine cytosolische und eine membrangebundene PIP_2 -Phospholipase C. Die lösliche Form des Enzyms hydrolysiert alle drei Phosphoinositide (62), jedoch werden bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen bevorzugt Polyphosphoinositide gespalten (63). Die Enzymaktivität läßt sich durch DG, Phosphatidylserin und freie Fettsäuren steigern. Auch Ca^{2+} wirkt stimulierend, jedoch ist es strittig, ob Ca^{2+} essentiell ist (62;64).

Erst die Entdeckung der membrangebundenen PIP_2 -Phospholipase C in Membranen von Zellen, die Ca^{2+} -mobilisierende Rezeptoren haben, konnte eine mögliche Kopplung von Rezeptor und Enzym wahrscheinlich werden lassen (65). Die membrangebundene PIP_2 -Phospholipase C Aktivität wurde lange als Kontamination mit dem löslichen Enzym erklärt. Heute ist allgemein akzeptiert, daß es beide Formen der PIP_2 -Phospholipase C gibt, auch wenn unklar ist, wie die relative Verteilung in der Zelle ist (66). Außerdem ist unklar, welchen Anteil das cytosolische Enzym an der Signaltransduktion hat. Charakteristisch für das Enzym in der Membran ist die Substratspezifität. Es katalysiert nur die Spaltung der Polyphosphoinositide.

Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der membrangebundenen PIP_2 -Phospholipase C ist umstritten. Es dominiert die Meinung, das Enzym sei bei der in vivo vorhandenen Calciumkonzentration nicht (67;68;69) oder nur mini-

mal (70) aktiv, jedoch gibt es auch gegensätzliche Auffassungen (71). Selbst wenn die PIP_2 -Phospholipase C bei den in der Zelle vorliegenden Ca^{2+} -Konzentration nicht aktiv ist, kann das Enzym durch die Aktivierung des Membranrezeptors stimuliert werden, ohne daß sich die Ca^{2+} -Konzentration vorher erhöhen muß (70;72).

Auf welche Weise führt eine Hormon-Rezeptor-Bindung zur Stimulierung der PIP_2 -Phospholipase C? Es gibt Hinweise, daß Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) in die Regulation der membrangebundenen PIP_2 -Phospholipase C einbezogen sind (59;73;74). Der Mechanismus der Agonist-Rezeptor-induzierten PIP_2 -Hydrolyse zeigt demnach eine große Parallelität zum Adenylat-Cyklase System auf.

Zur Zeit ist noch nicht geklärt, um welches G-Protein es sich im Falle der PIP_2 -Phospholipase C-Stimulierung handelt. Wahrscheinlich ist das involvierte G-Protein nicht identisch mit den schon bekannten Gi oder Gs (64;75).

Viele Enzyme werden durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Bennett und Crooke, 1987 (76) konnten zeigen, daß im Meer-schweinchen-Uterus sowohl die cytosolische als auch die membrangebundene PIP_2 -Phospholipase C von der Protein Kinase C in vivo phosphoryliert werden kann. Ob es sich dabei um eine Regulation der Enzymaktivität mit physiologischer Bedeutung handelt, ist noch unklar.

Es wurde schon erwähnt, daß IP_3 auch im Skelettmuskel als sekundärer Botenstoff agiert. Unabhängig von der Funktion des IP_3 für die Zelle setzt die Entstehung von IP_3 voraus, daß PI in den Membranen des Skelettmuskels zu PIP und PIP_2 phosphoryliert wird. Um die Bedeutung des PI-Stoffwechsels für den Skelettmuskel zu klären, müssen die PI-metabolisierenden Enzyme in der Muskelzelle nachgewiesen und lokalisiert werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung der subzellulären Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und der PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskelmembranen. Das ist möglich, weil durch Bindungsstudien mit verschiedenen Liganden die aufgetrennten Membranfraktionen eindeutig identifiziert werden können. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die PI-Kinase Aktivität nach der Trennung der Triaden in T-tubuli und terminale cisternae in beiden Membranfraktionen nachweisbar ist. Nur in den T-tubuli sind außerdem noch

PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C vorhanden. Das heißt, IP_3 kann ausschließlich in den T-tubuli entstehen.

Im Rahmen dieser Untersuchungen soll die PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskelfmembranen charakterisiert werden. Diese Charakterisierung ist notwendig, um die maximale potentielle Aktivität des Enzyms bestimmen zu können. Die nachgewiesene Enzymaktivität könnte einen Hinweis geben, ob durch ein Aktionspotential ausreichend IP_3 für eine IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR zur Verfügung gestellt werden kann. Wenn genügend IP_3 gebildet werden kann, ist die Beteiligung des PI-Stoffwechsels an der elektromechanischen Kopplung, wie es Vergara et al., 1985 (51) postulieren, denkbar. Die PIP_2 -Phospholipase C ist ein peripheres Membranprotein. Das Enzym wird als $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängiges Enzym mit einem pH-Optimum bei pH 6,7 charakterisiert. Auf Grund der Ca^{2+} -Abhängigkeit kann dem Ca^{2+} -Transient der Muskelzelle die jeweilige PIP_2 -Phospholipase C Aktivität zugeordnet und die maximale IP_3 -Akkumulation im Myoplasma berechnet werden. Das Ergebnis wird im Hinblick auf die Reizschwelle für IP_3 -induzierte Wirkungen diskutiert.

Außerdem wird untersucht, ob die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität im Skelettmuskel wie in anderen Geweben einer Hormon-Rezeptor-Kontrolle unterliegt. Voraussetzung dafür wäre der Nachweis spezifischer Rezeptoren, die den PI-Umsatz beeinflussen können oder wenigstens der nachweisliche Effekt bestimmter Agonisten. In diesem Zusammenhang wird auch untersucht, ob ein G-Protein in die Regulation der PIP_2 -Phospholipase C involviert sein kann.

Abschließend wird der PI-Stoffwechsel im Kaninchenskelettmuskel mit dem im Kaninchenherzmuskel verglichen. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen zeigen sich große Unterschiede bei der Metabolisierung des in den Membranen vorhandenen PI. Während die Inkubation mit $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ in Herzmikrosomen zur Bildung von PIP, PIP_2 und PA führt, entsteht in Skelettmuskelfmembranen nur relativ wenig PIP.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Isolierung von Skelettmuskeltriaden nach Lau et al., 1977 (77)

Die Triaden werden aus überwiegend weißer Rückenmuskulatur des Kaninchens isoliert. Dazu wird das Kaninchen durch einen Genickschlag getötet. Nach dem Ausbluten wird die Muskulatur freigelegt. Jedem Muskel wird 20 ml HEPES-Tyrode injiziert. Das Fleisch bleibt danach 30 min bei Raumtemperatur (RT) liegen. Jeder Muskel wird in 200-220 ml Lösung 1 homogenisiert (3 x 30 s im Waring-Blendor). Das Homogenat wird 15 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der durch Glaswolle filtrierte Überstand wird zweimal 70 min bei 100000 x g zentrifugiert. Das jeweilige Sediment nimmt man in Lösung 2 auf. Die Mikrosomen werden nun auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (15-50% w/w) aufgetragen. Pro 34 ml Gradient können 20-30 mg Protein aufgegeben werden. Es folgt eine isopyknische Zentrifugation über 15 h bei 45000 x g. Die Triaden lassen sich in dem Gradienten bei 36-42% Saccharose nachweisen. Zur Identifizierung dienen Bindungsstudien mit den Liganden Ouabain (s. 2.2.4.) oder PN 200-110 (s. 2.2.3.). Die Triaden werden in Lösung 2 verdünnt und 70 min bei 100000 x g zentrifugiert. Abschließend werden die Membranen in Lösung 2 aufgenommen und in kleinen Portionen bei -70 °C gelagert.

HEPES-Tyrode:

137,0 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl_2 ; 1,05 mM MgCl_2 ; 0,42 mM NaH_2PO_4 ; 5,0 mM Glucose; 10,0 mM HEPES; 1,0 mM NaN_3
pH 7,1

Lösung 1:

250 mM Saccharose; 2,0 mM Histidin; 0,5 mM EDTA/Tris pH 7,0; 0,1 mM PMSF
pH 7,6 - 7,7

Lösung 2:

250 mM Saccharose; 2,0 mM Histidin
pH 7,0 - 7,5

50% Saccharose:

150 g Saccharose; 150 g H₂O; 1,0 mM Histidin
pH 7,0 - 7,5 stellt sich ein

15% Saccharose:

45 g Saccharose; 255 g H₂O; 1,0 mM Histidin
pH 7,0 - 7,5 stellt sich ein

2.1.2. Trennung der Triaden in terminale cisternae und T-tubuli in einer Druckzelle nach Lau et al., 1977 (77)

Isolierte Triaden werden in einer French Press (SLM, Fa. Aminco, Urbana, USA) einem Druck von $5,3 \times 10^7$ Pa ausgesetzt. In Abhängigkeit vom Volumen der Membranen wird als Kammer eine 40 ml Zelle (FA-073) oder eine 3,7 ml Zelle (FA-003) verwendet. Die Kammer wird vor der Benutzung auf 4 °C gekühlt. Nach der Behandlung in der Druckkammer werden die Membranen auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetragen und über Nacht mit 45000 x g zentrifugiert. Anhand der Bindung des Liganden Ouabain (siehe 2.2.4.) oder PN 200-110 (siehe 2.2.3.) können die T-tubuli identifiziert werden. Sie sind bei ca. 29% Saccharose lokalisiert. Man sammelt die Fraktionen, die die T-tubuli enthalten, und verdünnt sie vorsichtig mit Lösung 1. Nach der Zentrifugation von 70 min bei 100000 x g wird das Sediment in Lösung 1 resuspendiert. Die T-tubuli werden bei -70 °C gelagert.

Lösung 1:

250 mM Saccharose; 2,0 mM Histidin
pH 7,0 - 7,5

2.1.3. Isolierung von Herzmuskelfmembranen aus Kaninchenventrikeln nach Brandt, 1985 (78)

Dem getöteten und ausgeblutetem Kaninchen wird das Herz entnommen und zum Transport kurze Zeit in 37 °C warme HEPES-Tyrode (siehe 2.1.1.) aufbewahrt. Aus dem noch aktiven Herz werden die Ventrikel präpariert und im Waring-Blendor in Lösung 1 homogenisiert. Das Homogenat wird 20 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird durch Glaswolle filtriert und anschließend zweimal 60 min bei 100000 x g zentrifugiert. Die zwei Sedimente werden in Lösung 2 aufgenommen. Zur Auftrennung der Mikrosomen in Dyaden und Plasmamembranen wird eine isopyknische Zentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten über 15 h bei 45000 x g durchgeführt. Die verschiedenen Membranen werden durch Bindungsstudien mit den Liganden PN 200-110 (siehe 2.2.3.) und QnB (siehe 2.2.2.) identifiziert. Anschließend werden die jeweiligen Membranfraktionen gesammelt und 1h 10 min bei 100000 x g zentrifugiert. Die Sedimente werden danach in Lösung 2 auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt, und die Membranen bei -70 °C gelagert.

Lösung 1:

250 mM Saccharose; 2,0 mM DTE; 0,2 mM EDTA/Tris pH 7,0; 0,1 mM PMSF (gelöst in Ethanol p.A.)
pH 7,2 - 7,5 stellt sich ein

Lösung 2:

250 mM Saccharose; 1,0 mM Histidin
pH 7,0 - 7,5 stellt sich ein

2.1.4. Darstellung von γ -³²P-ATP nach Walseth und Johnson, 1979 (79)

Die Präparation von γ -³²P-markiertem radioaktivem ATP erfolgt mit Hilfe einer Substratkettenphosphorylierung. Dabei wird ADP während der enzymatischen Konvertierung von L- α -Glycerophosphat zu 3-Phosphoglycerat phosphoryliert und es entsteht γ -³²P-ATP.

Der Reaktionsansatz enthält 370 MBq (10 mCi) ^{32}P -Phosphat (New England Nuclear, Dreieich) in Lösung 1. Der Ansatz hat ein Volumen von 90 μl . Die Reaktion wird durch die Zugabe von 10 μl Enzymlösung gestartet.

Der Einbau von ^{32}P -Phosphat in γ - ^{32}P -ATP wird verfolgt, indem man zu verschiedenen Zeitpunkten einen Aliquot (1 μl) entnimmt. Diese Probe wird in 50 mM KH_2PO_4 verdünnt und dient zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität. Um den Gehalt an freiem ^{32}P -Phosphat zu ermitteln, versetzt man die in KH_2PO_4 verdünnte Probe im Verhältnis 1:1 mit 20% Norit-A-Lösung (Aktiv-Kohle). Die Aktiv-Kohle bindet das ATP. Sie wird anschließend 2 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Radioaktivität des Überstandes repräsentiert das ungebundene ^{32}P -Phosphat. Die Menge an γ - ^{32}P -ATP errechnet sich aus der Differenz der beiden Werte. Wenn 90-95% des ^{32}P -Phosphates als γ - ^{32}P -ATP vorliegen, wird die Reaktion gestoppt, indem man den Reaktionsansatz auf Eis stellt. Die Reaktionsdauer beträgt 15-20 min. Abschließend wird die Lösung durch eine Zentrifugation über 15 min bei 10000 x g in ein Amicon-Filtrationsgefäß umfüllt. Dabei werden die Enzyme abfiltriert. Die Konzentration der Radioaktivität in der ATP-Lösung beträgt durchschnittlich 740 MBq/ml (20 mCi/ml). Das γ - ^{32}P -ATP wird bei -20 °C gelagert.

Lösung 1:

50 mM Tris/HCl pH 9,0; 12 mM MgCl_2 ; 6,5 mM DTE; 0,12 mM L- α -Glycerophosphat; 0,05 mM ADP; 0,5 mM β -NAD $^{+}$; 1,0 mM Na-Pyruvat

Enzymlösung:

100 μl Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase; 1 $\mu\text{g/ml}$ Triosephosphat-Isomerase; 100 $\mu\text{g/ml}$ Glyceraldehyd 3-Phosphat-Dehydrogenase; 10 $\mu\text{g/ml}$ 3-Phosphoglycerat Kinase; 50 $\mu\text{g/ml}$ Laktat-Dehydrogenase (Enzymlösungen von Boehringer, Mannheim).

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Bestimmung der PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität

Der Testansatz hat ein Volumen von 50 μl und enthält 5 μl Lösung 1 und 10 μl Substratlösung. Die PIP_2 -Endkonzentration beträgt 0,6 mM. Die Enzymreaktion findet bei 37 °C statt. Zu den gewählten Zeitpunkten werden 10 μl aus dem Reaktionsgemisch entnommen und zu 100 μl 10% TCA gegeben. Um eine bessere Präzipitation der Proteine und der Phospholipide zu erhalten, addiert man 50 μl einer wässrigen Lösung mit 10 mg/ml BSA. Das ^3H -markierte IP_3 bleibt in Lösung. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 10000 x g in einer Tischzentrifuge wird die Radioaktivität im Überstand gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität wird ein Aliquot aus dem Testansatz direkt in Scintillationsflüssigkeit gegeben. Als Leerwert dient ein Aliquot aus einem Reaktionsansatz, der kein Enzym enthält. Die Enzymaktivität ist proportional zur Konzentration der Membranproteine über einen Bereich von 0,05-2 mg/ml Testansatz. Die in dieser Arbeit angegebenen Hydrolysegeschwindigkeiten basieren auf vier Meßpunkten. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Proben nach 1, 2, 3 und 4 min entnommen und die ^3H -Wasserstoff-Radioaktivität gemäß 2.2.13. bestimmt.

Lösung 1 (10 x Konzentrat):

500 mM HEPES; 1 M NaCl; 20 mM EDTA; 20 mM EGTA;
39,62 mM Ca^{2+} (freie Ca^{2+} -Konzentration = 250 μM)
pH 6,8

Substratlösung:

10 mg PIP_2 (3mM); 20 mg Phosphatidylserin; 20 mg Phosphatidylethanolamin (alle Lipide von Sigma, München); 462,5 kBq (12,5 μCi) ^3H - PIP_2 (Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) gelöst in 3330 μl 50 mM HEPES, 100 mM NaCl
pH 7,0.

Die Substratlösung wird 30 min im Ultraschallbad (Sonorex TK 52; Bandelin, Berlin) inkubiert, damit sich die Lipide schneller zu Micellen formieren.

2.2.2. Bindungsstudie mit dem Liganden Quinuclidinyl Benzilate, L-(Benzilic-4,4-³H) nach Brandt und Busseff, 1986 (80)

Der Testansatz hat ein Volumen von 1 ml. Zu der Probe (200 µl) gibt man 800 µl Lösung 1, die 0,5 nM ³H-Wasserstoff markiertes QnB (New England Nuclear, Dreieich) enthält. QnB bindet spezifisch an muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren. Es wird deshalb in dieser Arbeit zur Identifizierung der Plasmamembranen aus Herzventrikeln verwendet. Nach der Inkubation (1 h bei Raumtemperatur) wird der Testansatz auf ein Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel) pipettiert. Die Flüssigkeit wird mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die restliche ungebundene Radioaktivität wird durch mehrmaliges Nachspülen mit Lösung 1 entfernt. Die an das Protein auf dem Filter gebundene Menge an QnB wird durch Messung der Radioaktivität bestimmt (siehe 2.2.13.).

Lösung 1:

100 mM Na₂PO₄; 25 mM NaH₂PO₄; 5 mM EDTA/Tris
pH 7,2

2.2.3. Bindungsstudie mit dem Liganden PN 200-110, (+)-(5-Methyl-³H) nach Brandt und Busseff, 1986 (80)

Die Dihydropyridin Bindungsstellen werden mit Hilfe von ³H-Wasserstoff markiertem PN 200-110 (New England Nuclear, Dreieich) bestimmt. PN 200-110 bindet spezifisch an die Ca²⁺-Kanäle in den T-tubuli (81). Die Bindungsstudien mit diesem Liganden werden im Rahmen dieser Arbeit sowohl zur Identifizierung freier T-tubuli als auch zum Nachweis von Triaden bzw. Dyaden angewendet. PN 200-110 ist lichtempfindlich, so daß die Bindung im Dunkeln oder im Rotlicht stattfinden muß. Die Konzentration des PN in Lösung 1 beträgt 0,5 nM für den Skelettmuskel und 0,25 nM für den Herzmuskel. 100 µl von jeder Fraktion des Gradienten werden mit jeweils 900 µl Lösung 1 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach gibt man die Probe auf einen Filter und entfernt mit einer Vakuumpumpe die Lösung. Die Filter werden mit Lösung 2 gewaschen. Anschließend wird die gebundene Radioaktivität bestimmt, wie unter 2.2.13. beschrieben ist.

Lösung 1:

200 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl
pH 7,4

Lösung 2:

100 mM Tris/HCl
pH 7,4

2.2.4. Markierung der T-tubuli mit ^3H -Ouabain nach Lau et al., 1977 (77)

Als Alternative zur Bindungsstudie 2.2.3. kann man T-tubuli mit ^3H -Ouabain markieren. Ouabain bindet an die Na-K-ATPase in den T-tubuli-Vesikeln. Die Isolierung der Membranen erfolgt, wie unter 2.1.1. bzw. 2.1.2. beschrieben ist, aber pro Rückenmuskel werden 740 kBq (20 μCi) ^3H -Ouabain, gelöst in 20 ml HEPES-Tyrode (siehe 2.1.1.), injiziert. Nach der isopyknischen Zentrifugation wird die ^3H -Wasserstoff-Radioaktivität gemäß 2.2.13. gemessen und damit die Lokalisation der T-tubuli im Gradienten bestimmt.

2.2.5. Lipidphosphorylierung

Die zu untersuchenden Membranen werden in einer Konzentration von 1 mg/ml bei 30 °C in Lösung 1 mit oder ohne zusätzlichem Substrat inkubiert. Das Volumen des Testansatzes beträgt 150 μl . Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 mM freiem Mg^{2+} gestartet.

Lösung 1:

100 mM KCl; 100 mM HEPES; 1 mM DTE; 1 mM EDTA; 5 mM ATP; 1-1.5 MBq γ - ^{32}P -Phosphat ATP/150 μl Testansatz
pH 7,5- 8,0

Substratlösung (6 x Konzentrat):

6 mM PI oder PIP; 2,40% Triton X-100; 100 mM KCl;

10 mM HEPES

pH 7,5

2.2.6. Extrahierung der sauren Lipide nach Schacht, 1981 (82)

Aus dem Reaktionsansatz der Lipidphosphorylierung (siehe 2.2.6.) wird ein Aliquot von 30 μ l entnommen. Die Probe wird in 800 μ l Chloroform: Methanol, 2:1 abgestoppt. Nach Zugabe von 150 μ l 2,4 N HCl kommt es zu einer Phasentrennung. Die Chloroformphase wird in ein neues Glas umgefüllt und 1 ml Methanol: 1N HCl, 1:1 addiert. Es erfolgt eine erneute Phasentrennung. Die untere Phase enthält die sauren Phospholipide. Zur Quantifizierung des in die Lipide eingebauten Phosphates wird die 32 P-Phosphat-Radioaktivität der unteren Chloroformphase gemessen (siehe 2.2.13.).

2.2.7. Identifizierung der phosphorylierten Lipide nach Shaigk und Palmer, 1977 (83)

Zur Auftrennung der 32 P-Phosphat markierten Phospholipide wird eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Als erstes wird eine Kieselgelplatte (Merck, Darmstadt, Art.-Nr.5715) vorbereitet. Dazu wird sie eine Stunde bei 100 °C erhitzt und dann mit 1% Kaliumoxalat in Methanol: Wasser, 2:3 besprüht. Nach der Trocknung 10 min bei 40 °C ist die Platte gebrauchsfertig. Die nach 2.2.6. extrahierten Lipide werden unter Stickstoff getrocknet und danach in einer kleinen Menge Chloroform aufgenommen. Es werden 20-30 Bq/Probe auf die vorbereitete Kieselgelplatte gegeben. Die mobile Phase besteht aus Chloroform: Aceton: Methanol: Essigsäure: Wasser im Volumenverhältnis 40: 15: 13: 12: 8. Am Ende der Chromatographie schließt sich eine Autoradiographie an (zwei Tage bei -70 °C mit einem Kodak X Omat Film). Als Referenz dienen PIP und PIP₂-Standards (Sigma, München). Die Referenzsubstanzen werden durch Bedampfung mit Jod sichtbar.

2.2.8. Bestimmung der Inositol-1-Phosphat Akkumulation im M. extensor digitorum longus (EDL) des Kaninchens nach Pennington und Martin, 1985 (84)

Von den fünf paarig vorhandenen Muskeln werden die vier kleineren sorgfältig und unverletzt präpariert. Die Muskeln werden mit D-myo-^{(3)H}-Inositol (603 kBq/nmol; Amersham, Braunschweig) vorinkubiert. Dazu inkubieren sie für 3 h in Krebs-Hydrogenkarbonat Puffer, der Karbogen (O₂: CO₂ = 95%: 5%) gesättigt ist. Die Inositol Konzentration dieses Puffers beträgt 1 µM (300 kBq/nmol). Anschließend werden die Muskel in Inositol-freiem Puffer gewaschen, in dem 10 mM LiCl gelöst sind. Nach 10 min wird Vasopressin bzw. Adrenalin in einer Endkonzentration von 10 µM addiert und für weitere 30 min inkubiert. Danach werden die Muskel abgespült und abgetrocknet. Nachdem man das Material in flüssigem Stickstoff eingefroren hat, wird es pulverisiert. Es folgt eine Lipidextrahierung nach Bligh und Dyer, 1959 (siehe 2.2.9.).

2.2.9. Lipidextrahierung nach Bligh und Dyer, 1959 (85)

Es werden zu jeweils 200 mg pulverisiertem Muskel (siehe 2.2.8.) 750 µl Chloroform/Methanol 1: 2 und anschließend 250 µl Wasser und 250 µl Chloroform addiert. Um die Phasen zu trennen, erfolgt eine Zentrifugation in der Tischzentrifuge über 2 min bei 8000 x g. Die in der wässrigen Phase vorhandenen Inositolphosphate werden dann nach der Methode von Berridge et al., 1982 (86) mittels einer Anionenaustauschchromatographie getrennt. Dazu werden Pasteurpipetten benutzt, die mit 1 ml Dowex-1X8 (Sigma, München) gefüllt sind. Die radioaktiven Phosphatester werden mit Lösung 1 eluiert. Zur Elution des Inositol-1-Phosphat, Inositol-1,4-bisphosphat und Inositol-1,4,5-trisphosphat werden die Lösungen 2, 3 und 4 in dieser Reihenfolge benutzt. Die Inositolphosphate werden anhand der Radioaktivität quantifiziert.

Die Chloroformphase mit den Phosphoinositiden wird mehrmals in Chloroform: Methanol: 154 mM NaCl, 5 mM Inositol im Verhältnis 3: 48: 47 gewaschen. Ein Aliquot der organischen Phase wird anschließend auf

seinen Gehalt an Radioaktivität untersucht (siehe 2.2.13.). Daraus läßt sich die Menge an ^3H -Inositol bestimmen, das in Phosphoinositide eingebaut ist.

Lösung 1:

5 mM Dinatrium-tetraborat; 60 mM Natriumformiat

Lösung 2:

0,1 M Ameisensäure; 0,2 M Ammoniumformiat

Lösung 3:

0,1 M Ameisensäure; 0,4 M Ammoniumformiat

Lösung 4:

0,1 M Ameisensäure; 1,0 M Ammoniumformiat

2.2.10. Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Akkumulation im Myoplasma

Der Berechnung des Ca^{2+} -Transienten während einer einzelnen Kontraktion liegt das Modell von Robertson et al., 1981 (87) zu Grunde. Der Ca^{2+} -Transient während einer tetanischen Stimulation ist simplifiziert nach einer Computerberechnung von Cannell und Allen, 1984 (88). Das in dieser Arbeit verwendete Basic-Programm wurde von Dr. R. Thieleczek erstellt. Die graphische Darstellung, sowie die Integralrechnung wurden mit Hilfe von Graphpad (ISI Software, Philadelphia) durchgeführt.

2.2.11. Proteinbestimmung nach Bradford, 1976 (89)

Das Grundprinzip dieser Methode liegt in der Verschiebung des Absorptionmaximums einer Coomassie-Blau-Färbelösung von 465 nm nach 595 nm durch Bindung an Protein.

Der Testansatz enthält 995 μ l Bradfordlösung plus 5 μ l Probe. Nach 30 min wird die OD bei 595 nm im Photometer UV-102 (Shimadzu, Langenberg) bestimmt. Die mit reinem Rinderserumalbumin (BSA) (Serva, Heidelberg) erstellte Eichung verläuft linear bis zu einer Proteinkonzentration von 8 μ g/ml Testansatz.

Bradfordlösung:

0,2 g Serva-Blue G 250 (Serva, Heidelberg); 100 ml Ethanol;
200 ml 86%ige ortho-Phosphorsäure
ad 2l

2.2.12. Bestimmung der Saccharose-Konzentration

Die Dichte der einzelnen Fraktionen eines Gradienten wird refraktometrisch bestimmt. In dem Refraktometer (Zeiss, Zürich, Art.-Nr.: 51921) kann die jeweilige Saccharose-Konzentration direkt abgelesen werden.

2.2.13. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wird im Liquid Scintillation Counter 1209 Rackbeta (LKB Wallace) gemessen. Zur Bestimmung der Strahlungsintensität von ^3H -Wasserstoff wird folgende Scintillationsflüssigkeit verwendet:

24,0 g Permablend (91% 2-5 Diphenyloxazol und 9% p-bis-(o-Methylstyryl) Benzol) in 2l Toluol/1l Triton X-100.

Für die Messung von ^{32}P -Phosphat verwendet man als Scintillationsflüssigkeit:

24,0 g Permablend, 375 g Naphtalin in 3l Dioxan.

2.2.14. Berechnung der freien Ionenkonzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} in Gegenwart von Komplexbildnern

Die Berechnung erfolgt mit Hilfe eines Basic-Programmes von Dr. R. Thieleczek. Die Komplexbildungskonstanten für $T = 25\text{ °C}$ sind der Zusammenstellung von Sillen/Martell (90) entnommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung der PIP_2 -Phospholipase C

3.1.1. pH - Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C

Am Anfang dieser Arbeit steht der direkte Nachweis und die Charakterisierung der membrangebundenen PIP_2 -Phospholipase C. Abb. 3 zeigt das Profil der pH-Abhängigkeit des Enzyms in Skelettmuskeltriaden.

Man erkennt, daß die membrangebundene PIP_2 -Phospholipase C der Skelettmuskeltriaden die größte spezifische Aktivität bei pH 6,7 aufweist. Die Enzymaktivität nimmt mit steigendem pH ab. Bei pH 7,8 ist sie fast unmeßbar. Den gleichen Kurvenverlauf erhält man, wenn statt Triaden T-tubuli oder mit KCl solubilisierter PIP_2 -Phospholipase C (siehe 3.2.3.) verwendet werden (nicht dargestellt).

Das Profil der Enzymaktivität deutet darauf hin, daß die PIP_2 -Phospholipase C nur in der protonierten Form aktiv ist. Die steile Phase in der Kurve läßt auf eine kooperative Protonenbindung schließen. Der Hill-Koeffizient dieser Reaktion beträgt 3,1.

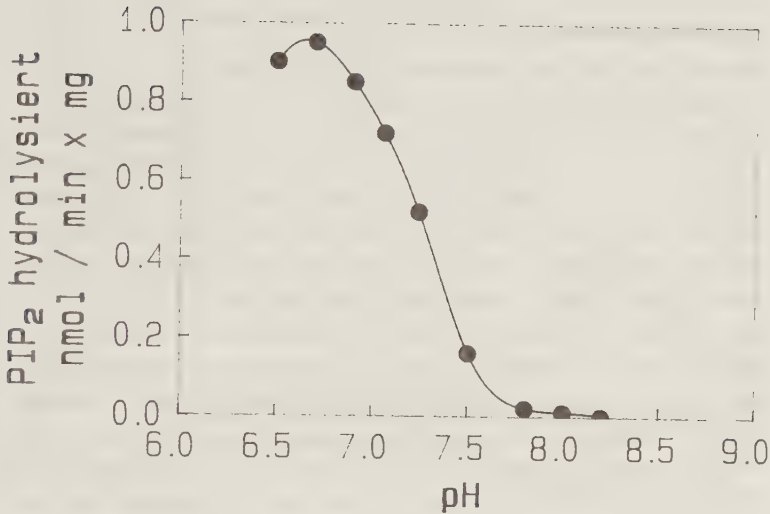


Abb. 3: pH-Abhängigkeit der membrangebundenen PIP₂-Phospholipase C in Skelettmuskeltriaden.

Die Durchführung der Phospholipase C-Aktivitätsbestimmung ist in 2.2.1. beschrieben. Der Testansatz enthielt 2 mM Mg²⁺; 3,4 µM Ca²⁺; 50 mM HEPES; 100 mM NaCl; 2mM EGTA; 2 mM EDTA sowie 0,15 mM PIP₂. Jede Enzymaktivität basiert auf der Messung des hydrolysierten PIP₂ nach 2, 4, 6 und 8 min. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Triaden (10 mg/ml) gestartet. Die Proteinkonzentration im Testansatz war 0,5 mg/ml. Die Berechnung der freien Ionenkonzentrationen und die Messung der ³H-Wasserstoff-Radioaktivität erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben ist (siehe 2.2.14. und 2.2.13.).

3.1.2. Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C von der freien Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration

Zur weiteren Charakterisierung der membrangebundenen PIP_2 -Phospholipase C wurde die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Enzym in Gegenwart oder Abwesenheit von Mg^{2+} bestimmt (Abb. 4).

Das Resultat der Aktivitätsmessung ohne Mg^{2+} zeigt einen sigmoiden Kurvenverlauf mit maximaler Aktivität bei 25 - 50 μM freiem Ca^{2+} . Es handelt sich um eine kooperative Ca^{2+} -Bindung mit einem Hill-Koeffizient von 1,4. Die Gegenwart von Ca^{2+} ist für die PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität essentiell. Erst ab einer freien Ca^{2+} -Konzentration von mehr als 0,1 μM ist eine PIP_2 -Hydrolyse nachweisbar. Das läßt die Vermutung zu, daß das Enzym bei der freien Ca^{2+} -Konzentration von 60 nM in einer ruhenden Muskelzelle nicht aktiv ist.

Abb. 4 zeigt, daß es bei Ca^{2+} -Konzentrationen größer als 100 μM zunehmend zu einer Inaktivierung der PIP_2 -Phospholipase C kommt. Diese Beobachtung ist schon aus Untersuchungen des Enzyms in anderen Geweben bekannt (61). Wahrscheinlich handelt es sich um eine Substratverarmung, bedingt durch eine Aggregation der Lipid-Vesikel.

Mg^{2+} hemmt die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität. In Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+} ist das Enzym nur noch zu 60% aktiv. Außerdem erhöht sich die zur halbmaximalen Aktivierung benötigte Ca^{2+} -Konzentration um den Faktor 10. Bei der in Abb. 4 verwendeten Triadenfraktion führte die Zugabe von 10 mM Mg^{2+} zu einer fast nicht mehr nachweisbaren Enzymaktivität.

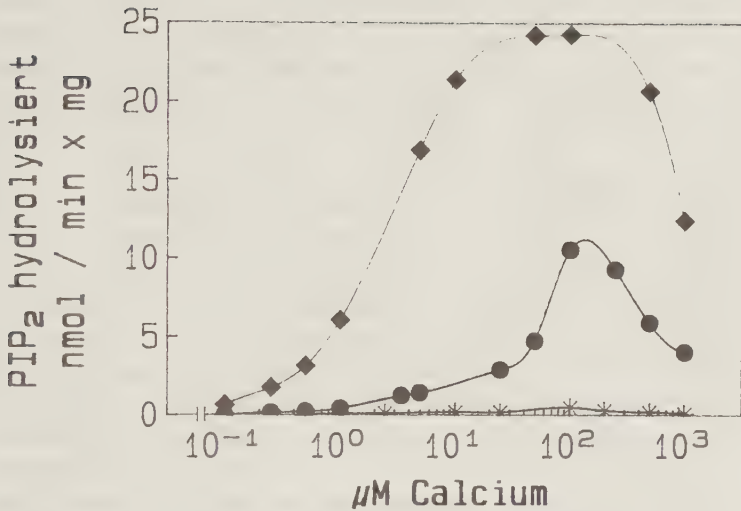


Abb. 4: Abhängigkeit der membrangebundenen Phospholipase C von der freien Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration.

Dargestellt ist die spezifische Enzymaktivität ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) in Gegenwart der jeweiligen Metallionen-Konzentrationen:

- (◆) ohne Mg^{2+}
- (●) 2,5 mM Mg^{2+}
- (*) 10,0 mM Mg^{2+}

Die Messung der Enzymaktivität und die damit verbundene Bestimmung der ^3H -Wasserstoff-Radioaktivität wurde gemäß 2.2.1. und 2.2.13. durchgeführt. Die angegebene PIP_2 -Hydrolyserate basiert auf vier Meßpunkten (2, 4, 6 und 8 min). Die freie Ionenkonzentration wurde mathematisch errechnet unter Berücksichtigung des konstanten pH-Wertes von 6,7 (siehe 2.2.14.). Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der Triaden, deren Konzentration im Testansatz 0,36 mg/ml war.

3.1.3. Hemmung der PIP_2 -Phospholipase C Aktivität durch Mg^{2+}

Abb. 5 zeigt die inhibierende Wirkung von Mg^{2+} auf die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität.

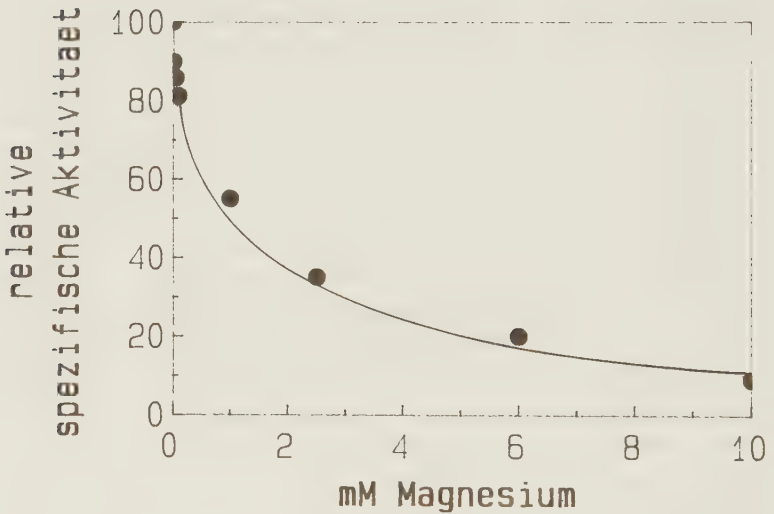


Abb. 5: Hemmung der PIP_2 -Phospholipase C Aktivität in Skelettmuskeltriaden durch Mg^{2+} .

Die PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität wurde gemäß 2.2.1. bei pH 6,7 und einer Ca^{2+} -Konzentration von 25 μM bestimmt. Die Konzentration der Triaden im Testansatz war 0,4 mg/ml. Dem Reaktionsgemisch wurde ein Aliquot nach 1, 2, 3 und 4 min entnommen und wie üblich analysiert.

Mit der Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration korreliert eine Abnahme der PIP_2 -Phospholipase C Aktivität. Dieser Effekt ist halbmaximal bei 1 mM Mg^{2+} . Er ist nicht auf die Erhöhung der Ionenstärke zurückzuführen. Wenn Mg^{2+} durch eine äquivalente Menge NaCl ersetzt wird, kommt es nicht zu einer Hemmung (der Versuch ist nicht dargestellt). Die dargestellte Mg^{2+} -Abhängigkeit zeigt sich auch, wenn T-tubuli oder die mit KCl solubilisierter PIP_2 -Phospholipase C (siehe 3.2.3.) im Test verwendet werden.

3.1.4. Einfluß von Saccharose und Triton X-100 auf die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität

Im Hinblick auf weitere Untersuchungen wurde die Beeinflussung der PIP_2 -Phospholipase C durch Saccharose und Triton X-100 untersucht. Die Wirkung des Zuckers auf die Enzymaktivität ist wichtig im Zusammenhang mit Versuchen zur Verteilung der PIP_2 -Phospholipase C in den Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten (siehe 3.2.1. und 3.2.2.). Auch der Einfluß von Triton X-100 ist von Interesse, weil dieses Detergenz im Testansatz der Lipidphosphorylierung vorhanden ist (siehe 2.2.5.). Das Resultat der Untersuchung ist in Abb. 6 zu sehen.

Man erkennt die inhibierende Wirkung beider Substanzen bei den gewählten Konzentrationen. Als Konsequenz davon wurde in folgenden Versuchen möglichst auf Triton X-100 verzichtet bzw. die Konzentration der Saccharose im Testansatz auf weniger als 10 % (w/w) beschränkt.

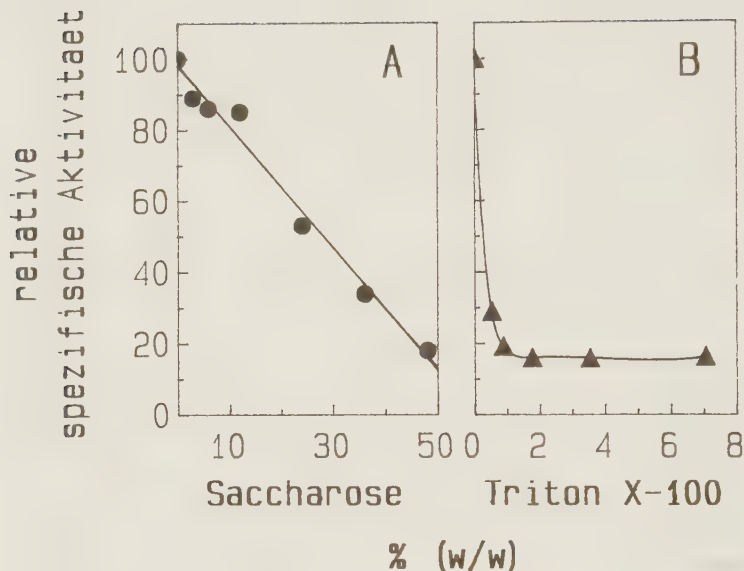


Abb. 6: Der hemmende Einfluß von Saccharose und Triton X-100 auf die PIP₂-Phospholipase C-Aktivität der Skelettmuskeltriaden.

Die Enzymaktivität der PIP₂-Phospholipase C in den Triaden wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von (A) Saccharose bzw. (B) Triton X-100 ermittelt. Die Testbedingungen waren optimal (siehe 2.2.1.), das bedeutet eine freie Ca²⁺-Konzentration von 25 µM und ein pH-Wert von 6,7. Die Reaktion lief jeweils über 4 min.

3.1.5. Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C Aktivität von der PIP_2 -Konzentration

Zur Bestimmung der Michaelis Menten Konstanten (K_m -Wert) und der maximalen Hydrolyserate ($V_{\max}$) wurde die Enzymaktivität unter Variation der PIP_2 -Konzentration gemessen (Abb. 7).

Die Computer-Berechnung ergab für die membrangebundene PIP_2 -Phospholipase C einen K_m -Wert von 0,61 mM PIP_2 ($\pm 1,3$) und eine maximale Geschwindigkeit von 136,9 ($\pm 11,6$) nmol $\times$ min $^{-1}$ $\times$ ml Triaden $^{-1}$. Unter den angegebenen Bedingungen entsprach das einer spezifischen PIP_2 -Phospholipase C Aktivität von 171,1 nmol $\times$ min $^{-1}$ $\times$ mg $^{-1}$. Alle Berechnungen der Substratkonzentration beziehen sich auf das exogene PIP_2 . Das in den Triaden selber vorhandene Substrat wurde nicht berücksichtigt.

3.2. Lokalisation der PIP_2 -Phospholipase C in den Skelettmuskelmembranen

3.2.1. Intrazelluläre Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C Aktivität zwischen Triaden und longitudinalem (leichtem) SR

Die Lokalisation der Enzymaktivitäten der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C in den Skelettmuskelmikrosomen nach isopyknischer Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten ist in Abb. 8 dargestellt.

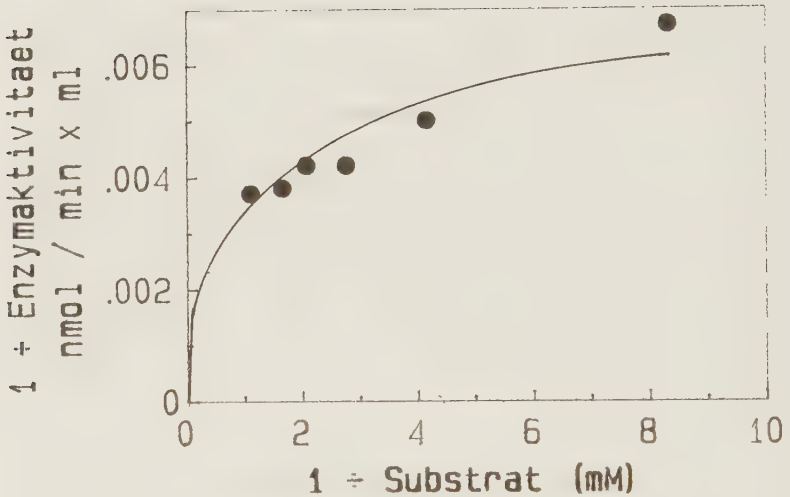
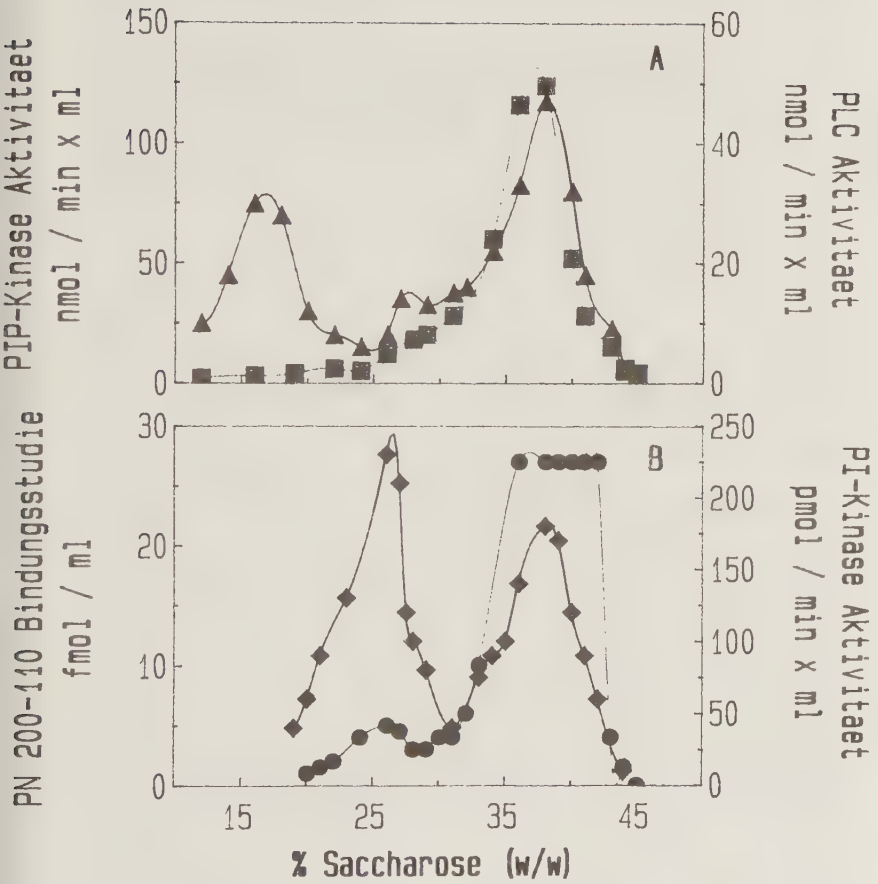


Abb. 7: Die Enzymaktivität der PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskeltriaden in Abhängigkeit von der PIP_2 -Konzentration, in doppelt-reziproker Darstellung nach Lineweaver/Burk.

Die PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität wurde bestimmt, wie unter 2.2.1. beschrieben ist, jedoch unter Variation der PIP_2 -Konzentration im Testansatz. Je nach Substrat-Konzentration wurde die Reaktionsdauer auf 1 bis 16 min festgesetzt, um die Kinetik der PIP_2 -Hydrolyse gut verfolgen zu können. Die eingesetzte Proteinkonzentration war 0,8 mg/ml. Für die Messung der ^3H -Wasserstoff-Radioaktivität siehe 2.2.13. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten Konstanten und der maximalen Geschwindigkeit wurde mit Hilfe von Graphpad, ISI Software, Philadelphia eine nicht-lineare Regression (Hyperbel-Fitting) durchgeführt.



Legende zu Abb. 8 siehe nächste Seite.

Abb. 8: Die intrazelluläre Verteilung von PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C zwischen Triaden und leichtem SR im Kaninchenskelettmuskel.

Auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (15% - 50% w/w) mit einem Volumen von 34 ml wurden ca. 25 mg Mikrosomen (präpariert nach 2.1.1.) aufgetragen und über Nacht bei 45000 x g zentrifugiert. Der Gradient wird anschließend fraktioniert (0,8-1,0 ml pro Fraktion), und auf die Verteilung verschiedener Enzymaktivitäten und Bindungsstellen untersucht. Das sind:

- (◆) Verteilung der PI-Kinase (siehe 2.2.5.)
- (■) Verteilung der PIP-Kinase (siehe 2.2.5.)
- (▲) Verteilung der Phospholipase C-Aktivität (siehe 2.2.1.)
- (●) Verteilung der PN 200-110 Bindungsstellen (siehe 2.2.3.)

Alle Untersuchungen der verschiedenen Enzymaktivitäten wurden unter den für das jeweilige Enzym optimalen Testbedingungen durchgeführt. Die Bestimmung der Dichte der Fraktionen des Gradienten ist unter 2.2.12. beschrieben.

Die isopyknische Zentrifugation führt zu einer Auftrennung der Skelettmuskelmikrosomen in Triaden und leichtes SR. Die Triaden werden anhand der Bindungsstudien mit dem Liganden PN 200-110 identifiziert (siehe 2.2.3.). Es ließ sich zeigen, daß die Triaden in dem Dichtegradienten bei 38-40% Saccharose nachweisbar sind. Das leichte SR ist bei ca. 26% Saccharose lokalisiert (77). Auch in diesen Fraktionen waren PN 200-110 Bindungsstellen nachweisbar, was ein Hinweis auf eine mögliche Kontamination mit freien T-tubuli oder Nicht-T-tubuli-Plasmamembranen sein kann.

Das Profil der Enzymaktivitäten zeigt, daß die PI-Kinase sowohl in den Triaden als auch im leichten SR vorkommt. Demgegenüber ist die Verteilung der PIP-Kinase auf die Triaden beschränkt. Das Profil der PIP_2 -Phospholipase C Aktivität zeigt zwei Maxima. Die Enzymaktivität ist in etwa zu gleichen Teilen auf die Triaden und das sogenannte Overlay verteilt. Unter Overlay versteht man die oberste Schicht des Gradienten bestehend aus der Lösung der aufgetragenen Probe mit allen nicht-membrangebundenen Enzymen. Weil die Präparation der Skelettmuskelmikrosomen zwei Hochgeschwindigkeitszentrifugationen beinhaltet (siehe 2.1.1.), kann man davon ausgehen, daß nur membrangebundene Enzyme auf den Gradienten aufgetragen wurden. Die im Overlay erscheinende Enzymaktivität basiert deshalb wahrscheinlich auf einer aus den Membranen herausgelöster PIP_2 -Phospholipase C. Zusätzlich er-

scheint ein kleiner Aktivitätsgipfel bei ca. 27% Saccharose, der ebenfalls auf eine Kontamination des leichten SR mit anderen Membranen hinweist.

In Skelettmuskelmikrosomen konnten keine Bindungsstellen für den an die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren bindenden Liganden QnB (s. 2.2.2.) nachgewiesen werden (die Bindungsstudie ist nicht dargestellt).

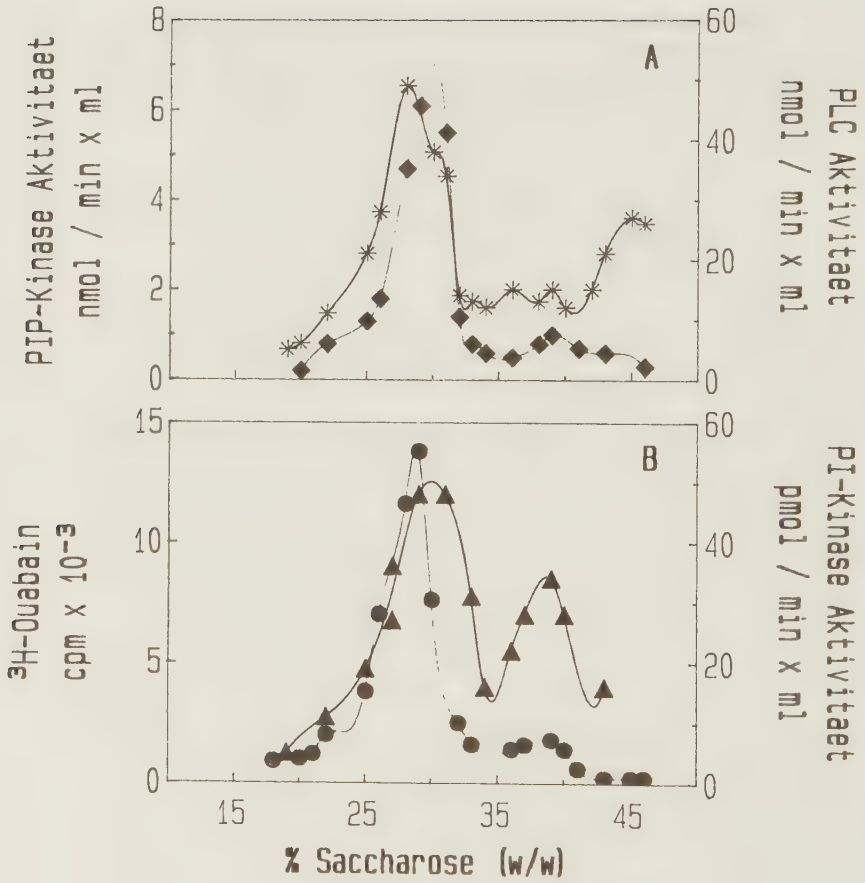
3.2.2. Intrazelluläre Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C zwischen T-tubuli und terminalen cisternae

Isolierte Triaden wurden in einer Überdruckzelle (French-Press) mechanisch in T-tubuli und terminalen cisternae aufgeschlossen. Die Auftrennung der Membranen erfolgte durch Zentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten. Die Verteilung der untersuchten Enzymaktivitäten in dem Dichtegradienten ist in Abb. 9 dargestellt.

Auf Grund der Bindungsstudie mit ^3H -Ouabain ließen sich die freien T-tubuli bei ca. 29% Saccharose nachweisen. Die terminalen cisternae werden durch die Ca^{2+} -Transport ATPase Aktivität identifiziert. Auf Grund der Verteilung dieser Enzymaktivität konnten die terminalen cisternae bei 34-42% Saccharose lokalisiert werden (nicht dargestellt). Sowohl in T-tubuli als auch in terminalen cisternae war eine PI-Kinase Aktivität nachweisbar. Demgegenüber war die PIP-Kinase Aktivität beinahe ausschließlich in den T-tubuli lokalisiert. Nur bei etwa 38-40% Saccharose ließ sich noch eine geringe Aktivität nachweisen. Zusammen mit dem Nachweis von Ouabain-Bindungsstellen in diesen Fraktionen kann man davon ausgehen, daß ein Teil der T-tubuli noch in Form von Triaden vorlag.

80% der PIP_2 -Phospholipase C waren mit den T-tubuli assoziiert. Die restliche Aktivität war in den terminalen cisternae und, vermutlich auf Grund von Aggregationen, bei ca. 45% Saccharose lokalisiert.

Die dargestellten Verteilungen der Enzymaktivitäten zeigen, daß PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C nur in den T-tubuli gemeinsam vorhanden sind.



Legende zu Abb. 9 siehe nächste Seite.

Abb. 9: Die intrazelluläre Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP₂-Phospholipase C zwischen T-tubuli und terminalen cisternae.

Triaden wurden gemäß 2.1.1. präpariert, und anschließend in einer French Press einem Druck von $5,3 \times 10^7$ Pa ausgesetzt. Die Membranen wurden danach mittels einer isopyknischen Zentrifugation aufgetrennt. Dazu wurden ca. 30 mg Membranen auf 34 ml Saccharosegradient aufgetragen und 15 h bei $45000 \times g$ zentrifugiert. Der fraktionierte Dichtegradient (0,8-1,0 ml/Fraktion) wurde auf folgende Verteilungen untersucht:

- (▲) PI-Kinase Aktivität (siehe 2.2.5.)
- (◆) PIP-Kinase Aktivität (siehe 2.2.5.)
- (*) PIP₂-Phospholipase C-Aktivität (siehe 2.2.1.)
- (●) Ouabain-Bindungsstellen (siehe 2.2.4.)

3.2.3. Lokalisation der PIP₂-Phospholipase C in den T-tubuli

Um die Frage zu entscheiden, ob die PIP₂-Phospholipase C ein integrales oder peripheres Membranprotein ist, wurde untersucht, ob sich das Enzym aus isolierten Triaden durch 600 mM KCl solubilisieren läßt. Dazu wurden die Membranen vor der isopyknischen Zentrifugation 10 min bei 4 °C in 250 mM Saccharose; 2 mM Histidin; 600 mM KCl inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 10 zu sehen.

Im Kontrollversuch blieb die Verteilung der PIP₂-Phospholipase C Aktivität auf die Triaden beschränkt. Durch 600 mM KCL ließ sich fast ein Drittel der Membranproteine herauslösen, darunter auch der größte Teil der PIP₂-Phospholipase C. 80% dieser Enzymaktivität war im Overlay des Gradienten nachweisbar. Diese Solubilisierung führte zu einer zwei- bis dreifache Anreicherung des Enzyms. Die Tatsache, daß die PIP₂-Phospholipase C durch eine hohe Salzkonzentration aus den Membranen herauszulösen ist, deutet auf ein peripheres Membranprotein hin. Die solubilierte- und membrangebundene PIP₂-Phospholipase C unterscheiden sich nicht in ihrer Ca²⁺/Mg²⁺-Abhängigkeit oder in ihrem pH-Optimum.

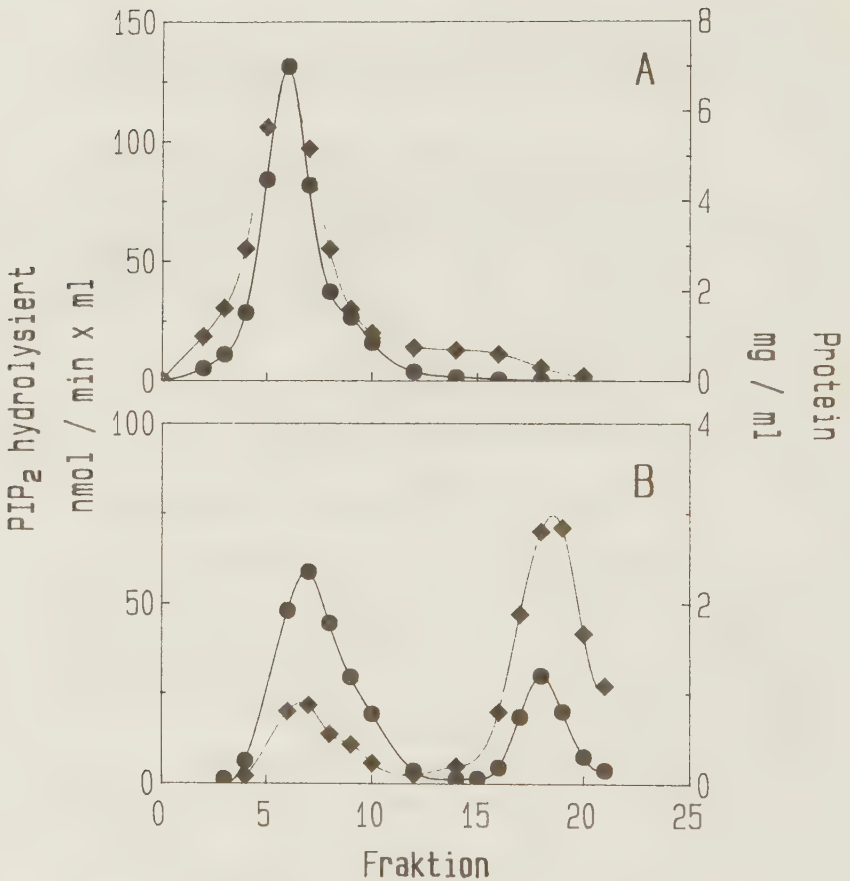


Abb. 10: Die Solubilisierung der membrangebundenen PIP₂-Phospholipase C aus Skelettmuskeltriaden mit 600 mM KCl.

30 mg einer Mikrosomenpräparation (siehe 2.1.1.) wurden unbehandelt (A) oder nach Inkubation mit 600 mM KCl (B) auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und 15 h bei 45000 x g zentrifugiert. Die Fraktionen (1-1,5 ml/Fraktion) wurden anschließend auf

(●) Proteingehalt (siehe 2.2.11.)

(◆) PIP₂-Phospholipase C-Aktivität (siehe 2.2.1.)

untersucht. Damit der Anteil des Overlays am Gradienten nicht zu groß war, wurde das Volumen der aufgetragenen Mikrosomen auf 2 ml beschränkt. Die PIP₂-Phospholipase C-Aktivität wurde bei pH 6,7 und in Gegenwart von 25 μ M Ca²⁺ gemessen.

3.2.4. Vergleich der in den Skelettmuskelmembranen gemessenen PIP₂-Phospholipase C Aktivität mit anderen Geweben

In Tab. 1 wird die in Skelettmuskel T-tubuli gemessene PIP₂-Phospholipase C Aktivität mit denen in anderen Geweben verglichen.

Gewebe	Aktivität nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹	Literatur
Hamster-		
Blutplättchenmembranen	0,002	(91)
Fibroblasten	2,0	(92)
Zirbeldrüse	77,0	(93)
Rattenleber-		
Plasmamembranen	56,0	(94)
Speicheldrüsen-		
Membranen	3,0	(95)
Kaninchenherz-		
Überstand	2,0	(96)
Kaninchengehirn-		
Überstand	8,0	(96)
Kaninchenleber-		
Überstand	0,7	(96)
Hühnerembryonen-		
Überstand	8,9	(96)
Kaninchen T-tubuli	30,0	

Tab. 1: Ein Vergleich der PIP₂-Phospholipase C-Aktivitäten in verschiedenen Geweben.

Bei den angegebenen Enzymaktivitäten handelt es sich jeweils um die maximale PIP₂-Hydrolyserate bei optimalen Bedingungen. Die PIP₂-Phospholipase C Aktivität in den Kaninchen T-tubuli variiert in Abhängigkeit von der Präparation zwischen 10 und 30 nmol x min⁻¹ x mg⁻¹. Alle Aktivitäten geben die Geschwindigkeit für die PIP₂-Hydrolyse von exogenem Substrat an.

Aus dieser Übersicht wird deutlich, daß die in Skelettmuskelmembranen gemessene PIP_2 -Phospholipase C Aktivität denen anderer Gewebe entspricht. Das heißt, daß der PI-Stoffwechsel im Skelettmuskel die gleiche Bedeutung besitzen könnte, wie der in den oben aufgeführten Systemen.

3.3. Versuche zur Regulation der PIP_2 -Phospholipase C

3.3.1. PIP_2 -Phospholipase C Aktivität mit und ohne $\text{GTP}\gamma\text{S}$

Wie schon erwähnt, ist in vielen Geweben eine Regulation der PIP_2 -Phospholipase C über ein bisher noch nicht identifiziertes G-Protein nachgewiesen worden. So steigert GTP z.B. in Rattenleber Mikrosomen die Ca^{2+} -Affinität des Enzyms (70). Wenn auch in den Membranen des Skelettmuskels ein G-Protein in die Regulation der PIP_2 -Phospholipase C involviert ist, sollte die Enzymaktivität durch Zugabe des nicht-hydrolysierbaren $\text{GTP}\gamma\text{S}$ zu steigern sein. Die Versuche wurden in Gegenwart von 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ durchgeführt. Das entspricht einer Konzentration, welche in anderen Geweben die maximale Aktivierung des PI-Stoffwechsels bewirkt (70). Das Ergebnis ist in Abb. 11 dargestellt.

Man erkennt, daß 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ die Ca^{2+} -Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C nicht beeinflussen konnte. Das gleiche Resultat ergab sich im Falle der pH- und Mg^{2+} - Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C (nicht dargestellt). Taylor und Exton, 1987 (70) behaupten, daß das $\text{GTP}\gamma\text{S}$ nur in Gegenwart von 2-5 mM Mg^{2+} die Ca^{2+} -Abhängigkeit der PIP_2 -Phospholipase C aus Leber-Plasmamembranen verändert. Die PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskelmembranen ist demgegenüber auch in Gegenwart von 2,5 mM Mg^{2+} nicht durch 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ zu stimulieren (nicht dargestellt).

Die Möglichkeit, daß $\text{GTP}\gamma\text{S}$ nur deshalb keinen Effekt auf die Enzymaktivität hat, weil sich das Nukleotid und das entsprechende G-Protein auf verschiedenen Seiten der Membran befanden, wurde ebenfalls ausgeschlossen. In Gegenwart von α -Toxin (Behringwerke, Marburg), einem Protein, das die Membranen für Moleküle mit einem Durchmesser von 2-3 nm permeabilisiert (97), zeigte sich auch keine Wirkung von $\text{GTP}\gamma\text{S}$.

Auch die mit KCL aus den Triaden herausgelöste PIP_2 -Phospholipase C war durch 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ nicht zu aktivieren.

Die gleichen Ergebnisse werden erzielt, wenn 0,1 mM GTP statt 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ in den Versuchen eingesetzt wird.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß es keinen Hinweis auf eine Kopplung der PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskelmembranen an ein G-Protein gibt.

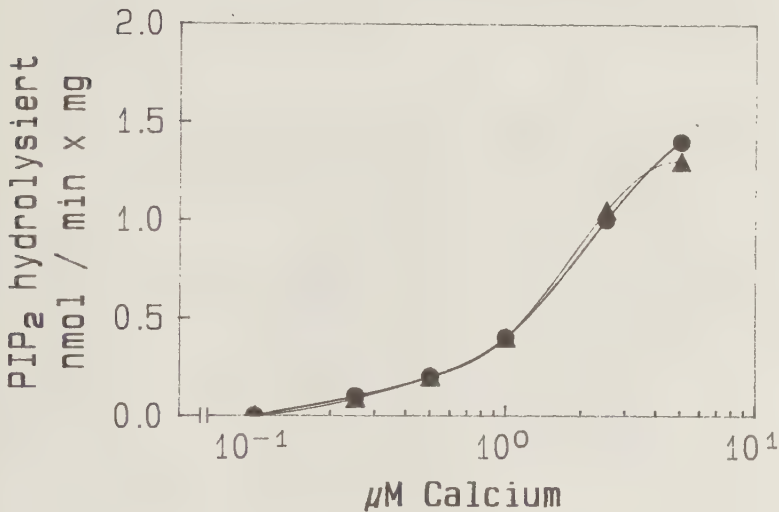


Abb. 11: Die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$.

Triaden wurden wie unter 2.1.1. beschrieben ist, isoliert. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der membrangebundenen PIP_2 -Phospholipase C wurde (●) ohne $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und (▲) in Gegenwart von 0,1 mM $\text{GTP}\gamma\text{S}$ untersucht. Die Messung der Enzymaktivität ist in 2.2.1. beschrieben. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe der Membranen. Deren Endkonzentration im Testansatz war 0,36 mg/ml.

3.3.2. Einfluß von α - und β -Agonisten auf die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität

Der folgende Versuch sollte zur Klärung der Frage dienen, ob die PIP_2 -Phospholipase C möglicherweise in die Signaltransduktion von α - oder β -Agonisten involviert sein könnte. Dazu wurden Triaden mit Isoprenalin (β -Agonist) und Phenylephrin (α -Agonist) inkubiert und die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität mit der unter Kontrollbedingungen gemessenen verglichen (Abb. 12).

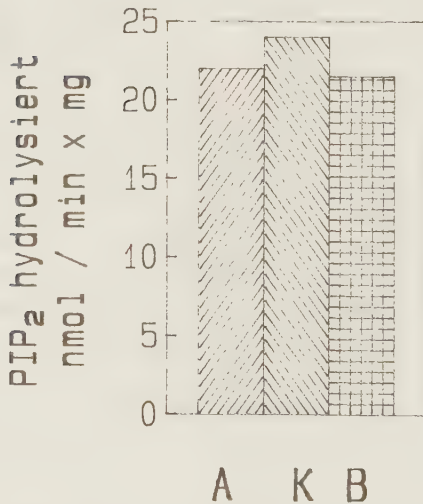


Abb. 12: Die Wirkung von α - und β -Agonisten auf die PIP_2 -Hydrolyserate der PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskel-triaden.

Die PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität wurde gemessen, wie in 2.2.1. beschrieben ist (K) ohne Agonisten, (A) in Gegenwart von $200 \mu\text{M}$ des β -Agonisten Isoprenalin und (B) $200 \mu\text{M}$ des α -Agonisten Phenylephrin. Die Reaktionsdauer war in allen Fällen 4 min.

Abb. 12 zeigt, daß weder 200 μ M Isoprenalin (β -Agonist) noch 200 μ M Phenylephrin (α -Agonist) die Enzymaktivität signifikant beeinflussen. Dieses Ergebnis änderte sich auch nicht, als zur Permeabilisierung der Membranen α -Toxin im Testansatz vorhanden war, um die Zugänglichkeit der Rezeptoren für die Agonisten zu garantieren.

In 3.2.1. wurde schon darauf hingewiesen, daß in Skelettmuskelmembranen keine Bindungsstellen für muskarinerge Acetylcholinrezeptoren nachweisbar waren. In Übereinstimmung damit hatten auch die Agonisten Pilocarpin und Carbachol in einer Konzentration von 0,1 mM keinen Einfluß auf die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität (nicht dargestellt).

3.3.3. Einfluß von Adrenalin und Vasopressin auf die Inositol-1 Phosphat Akkumulation im M. extensor digitorum longus (EDL) des Kaninchens

In Ergänzung zu 3.3.2. wurde untersucht, ob es nach Inkubation eines weißen Kaninchenskelettmuskels mit einem α -Agonisten (Adrenalin) zu einem erhöhten PI-Umsatz kommt. Als Indikator dafür wurde die Konzentration des Inositol-1-P (Ins-1-P) im Muskel gewählt. Wie schon erwähnt, gibt es Hinweise, daß die Inkubation eines Ratten-Hemidiaphragmas mit Adrenalin zu einer Ins-1-P Akkumulation führt (28). Am EDL des Kaninchens wurde außerdem der mögliche Einfluß von Vasopressin mitgetestet. Das Resultat ist in Abb. 13 zu sehen.

Man erkennt, daß es in keinem Fall unter den gegebenen Testbedingungen zu einer entscheidenden Erhöhung des ^3H -Ins-1-P Gehaltes (relativ zum Muskelgewicht) kommt. Damit ließen sich die an überwiegend roter Rattenmuskulatur gezeigten Ergebnisse (28) für die weiße Kaninchenmuskulatur nicht bestätigen.

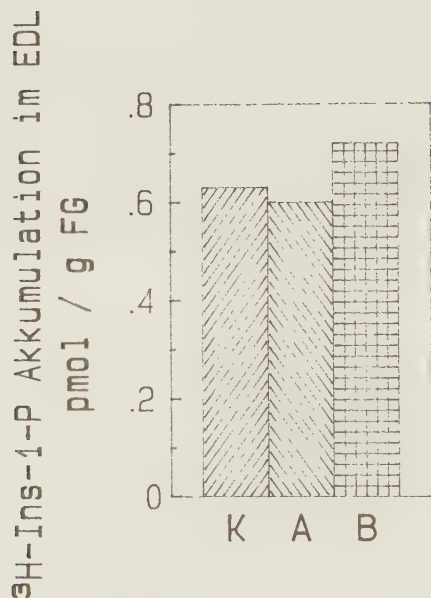


Abb. 13: Der Einfluß von Adrenalin und Vasopressin auf die Ins-1-P Akkumulation im Kaninchen EDL.

Die genaue Versuchsdurchführung ist unter 2.2.8. beschrieben. Die Abb. zeigt das Ergebnis einer Doppelbestimmung der Ins-1-P Akkumulation der paarig vorhandenen EDL des Kaninchens. Die Muskeln wurden unverletzt präpariert. Nach der Inkubation der Muskeln mit $1 \mu\text{M}$ $^3\text{H-Inositol}$ für 3 h wurden sie weitere 30 min (K) ohne Hormon (A) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Adrenalin und (B) in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Vasopressin inkubiert. Als Inositol-Phosphatase-Hemmstoff war 10 mM LiCl im Medium vorhanden. FG=Muskelfrischgewicht.

3.4. Berechnungen zur potentiellen PIP_2 -Hydrolyse der PIP_2 -Phospholipase C

Die bisherigen Untersuchungen ergaben keinen Hinweis darauf, daß der PI-Stoffwechsel im Kaninchenskelettmuskel in die Signaltransduktion von α -, β - oder Muskarin-Rezeptoren involviert ist. Deshalb soll im Folgenden u.a. die Hypothese von Vergara et al., 1985 (51) überprüft werden, wonach der PI-Umsatz an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sei. Dafür werden die bisher beschriebenen Enzymaktivitäten im Kaninchenskelettmuskel zu Grunde gelegt. Es soll geklärt werden, welche IP_3 -Konzentrationen in den jeweiligen Phasen der Muskelzelle (Ruhezustand, Aktionspotential oder Ca^{2+} -Transient) erreicht werden können.

3.4.1. Konzentration von PI, PIP und PIP_2 in den T-tubuli

Bevor die gemessene PIP_2 -Hydrolyse mit der theoretisch zu fordernden Aktivität verglichen wird, muß geklärt sein, wieviel Substrat für die PI-metabolisierenden Enzyme in den Membranen vorhanden ist.

Der PI-Gehalt in den T-tubuli beträgt $0,1 \mu\text{mol/mg}$ Protein (98)

Daraus ergeben sich bei einem Verhältnis PI: PIP: PIP_2 = 85%: 11%: 4% folgende Konzentrationen:

100,0 nmol PI/mg T-tubuli

13,0 nmol PIP/mg T-tubuli

4,7 nmol PIP_2 /mg T-tubuli (wird auf 5 nmol/mg gerundet)

Aus dem Vergleich der PIP_2 -Konzentration in den T-tubuli mit dem gesamten PIP_2 -Gehalt im Muskel läßt sich das Verhältnis mg T-tubuli/mg Muskel berechnen. Die Voraussetzung ist, daß alles PIP_2 der Muskelzelle ausschließlich in den T-tubuli lokalisiert ist.

Der gesammte PIP_2 -Gehalt im Muskel ist:

$$4\text{-}6 \text{ pmol } \text{PIP}_2 / \text{mg Muskel (58)}$$

Daraus folgt:

$$5 \text{ nmol } \text{PIP}_2 / \text{mg T-tubuli} \div 5 \text{ pmol } \text{PIP}_2 / \text{mg Muskel} = 0,001$$

Das heißt, nur 0,1% der Muskelzelle sind T-tubuli.

Die Muskelzelle besteht zu 58% aus wässriger Phase, dem Myoplasma (99). Daraus lassen sich unter Berücksichtigung des Volumenverhältnisses T-Tubuli/Muskelzelle folgende Phosphoinositidkonzentrationen berechnen (Tab 2):

Phospholipid	Konzentration in mM
PI	172,0
PIP	22,4
PIP_2	8,1

Tab. 2: Konzentration der Phosphoinositide in den T-tubuli aus Kaninchenskelettmuskel.

Den berechneten Werten liegen die Angaben von Roseblatt et al., 1981 (98) zu Grunde. Die Daten sind als Konzentration bezogen auf das Myoplasma angegeben. Dabei wurde davon ausgegangen, daß ein mg Muskel einem μl Muskel entspricht (99).

3.4.2. Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Akkumulation während einer einzelnen Muskelkontraktion

Die PIP_2 -Phospholipase C in den T-tubuli ist absolut Ca^{2+} -abhängig (3.1.2.). Auf Grund dieser Abhängigkeit kommt dem Ca^{2+} -Transienten der Muskelzelle bei der Aktivierung des Enzyms entscheidende Bedeutung zu. Deshalb wird im Folgenden der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration die entsprechende PIP_2 -Phospholipase C Aktivität zugeordnet.

Der Berechnung liegen folgende Prämissen zu Grunde:

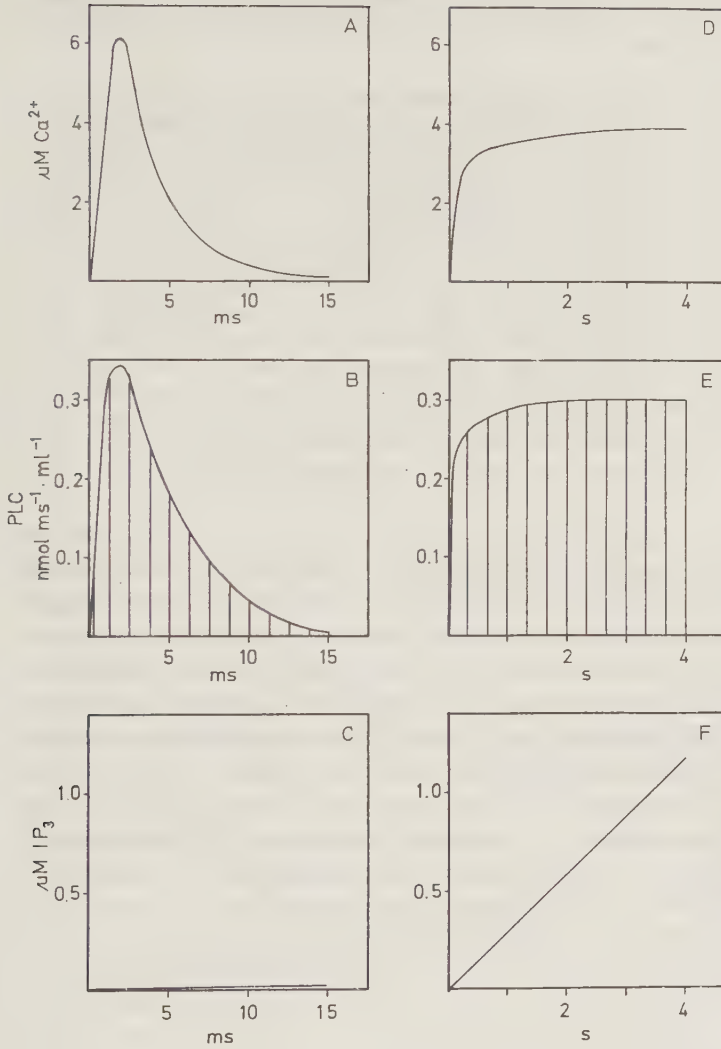
- Die freie Ca^{2+} -Konzentration in der Muskelzelle beträgt 60 nM (4).
- Die PIP_2 -Phospholipase C ist bei der Ca^{2+} -Konzentration im ruhenden Muskel nicht aktiv.
- Die Enzymaktivität ist sofort im Gleichgewicht mit der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration während des Transienten. Außerdem wird davon ausgegangen, daß das Enzym Substrat-gesättigt ist. Der Berechnung der PIP_2 -Konzentration in den T-tubuli zu Folge ist das gegeben.
- Zur Berechnung des Ca^{2+} -Transienten wurde das Computer-Modell von Robertson et al., 1981 (87) herangezogen.
- Als Enzymaktivität wird die durchschnittliche Hydrolyse von $30 \text{ nmol } \text{PIP}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ zu Grunde gelegt. Das ist die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität in den T-tubuli bei optimalen Testbedingungen (siehe 2.2.1.).
- Die freie Mg^{2+} -Konzentration in der Muskelzelle wird mit 1 mM angenommen. Diese Mg^{2+} -Konzentration reduziert die Enzymaktivität auf $16 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.
- Das Volumen des Myoplasmas beträgt 58% der Muskelzelle (99).
- Die Muskelzelle enthält 0,1 Vol.-% T-tubuli (s.o.). Daraus läßt sich eine Enzymaktivität von $16 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Muskel}^{-1}$ errechnen.
- IP_3 katabolisierende Reaktionen werden vernachlässigt. Ebenso wird davon ausgegangen, daß die IP_3 -Konzentration im Ruhezustand vernachlässigbar gering ist, da die PIP_2 -Phospholipase C nicht aktiv ist.

- Diffusionsprozesse des IP_3 werden nicht berücksichtigt

Im Falle der einzelnen Muskelkontraktion ist der Ca^{2+} -Transient durch folgende Gleichung beschrieben:

$$p\text{Ca}(t) = p\text{Ca}_{\text{Ruhe}} - A \times (e^{-t/f} - e^{-t/r})$$

- $p\text{Ca}(t)$ = Die gesuchte Ca^{2+} -Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt.
- $p\text{Ca}_{\text{Ruhe}}$ = Die Ca^{2+} -Konzentration im Myoplasma im Ruhezustand der Muskelzelle.
- A = Multiplikationsfaktor. Er beträgt 3,26 für den schnellen Muskel und 2,56 für den langsamen Muskel.
- r = Zeitkonstante für die ansteigende Phase. Sie wird mit 0,5 ms für den Skelettmuskel und 3,0 ms für den Herzmuskel angegeben.
- f = Zeitkonstante für die fallende Phase. Sie beträgt 15 ms für den Skelettmuskel bzw. 170 ms für den Herzmuskel.



Legende zu Abb. 14 siehe nächste Seite.

Abb. 14: IP_3 -Akkumulation im Myoplasma eines schnellen Muskels während einer einzelnen Muskelkontraktion und während eines Tetanus.

Abb. 14 zeigt das Ergebnis der Berechnungen (A-C) für eine einzelne Kontraktion und (D-F) für einen Tetanus über 4 s. Die Prämissen, die dieser Rechnung zu Grunde liegen, sind im Text erläutert. Es wird der (A und D) Ca^{2+} -Transient dargestellt, sowie die daraus resultierende (B und E) Aktivitätskurve der PIP_2 -Phospholipase C in den T-tubuli. Durch Integration der Aktivitätsprofile errechnet sich (C und F) die IP_3 -Konzentration im Myoplasma. Die Berechnungen der Ca^{2+} -Transienten stützen sich auf Computermodele von Robertson et al., 1981 (87) und Cannell und Allen, 1984 (88). Die Aktivitätskurven wurden ermittelt, wie im Text beschrieben ist. Das Integral der Kurve wurde mit Hilfe von Graphpad, ISI Software, Philadelphia errechnet. Im Falle der Einzelkontraktion wurde dabei eine Dauer des Ca^{2+} -Transienten von 50 ms angenommen, auch wenn aus Gründen der Übersicht nur 15 ms graphisch dargestellt sind.

Abb. 14 A zeigt den Verlauf des Ca^{2+} -Transienten für einen schnellen Muskel. Die maximale Ca^{2+} -Konzentration beträgt $6,1 \mu\text{M}$. Diese Konzentration ist nach 2 ms erreicht. Das entspricht einer Zeitspanne, die auch in anderen Berechnungen ermittelt wurde (51). Die Ca^{2+} -Konzentration fällt danach rapide ab. Sie nähert sich asymptotisch gegen Null. Die gesammte Zeitdauer des Transienten beträgt 30-50 ms. Im Weiteren wird mit einer Dauer von 50 ms gerechnet.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Bedingungen läßt sich die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität für die jeweilige Ca^{2+} -Konzentration angeben. Dabei wird der sigmoide Kurvenverlauf der Ca^{2+} -Abhängigkeit (siehe 3.1.2.) durch folgende Beziehung wiedergegeben:

$$\text{PLC}(\text{Ca}^{2+}) = \text{PLC}_{\text{max}}(\text{Ca}^{2+}) \times (\text{K} \times \text{Ca}^{2+})^n / 1 + (\text{K} \times \text{Ca}^{2+})^n$$

- $\text{PLC}(\text{Ca}^{2+})$ = Die gesuchte PIP_2 -Phospholipase C Aktivität zu der jeweiligen Ca^{2+} -Konzentration.
 $\text{PLC}_{\text{max}}(\text{Ca}^{2+})$ = Die maximale Enzymaktivität bei optimaler Ca^{2+} -Konzentration (25 μM) in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} . Als Wert wurde 16 nmol $\times$ min $^{-1}$ $\times$ mg $^{-1}$ gemessen.
 K = Die Affinitätskonstante des Enzyms für Ca^{2+} . Sie beträgt $4,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.
 n = Der Hillkoeffizient für die Ca^{2+} -Abhängigkeit. Er beschreibt die Kooperativität der Bindung an das Enzym. Als Wert wurde 1,4 bestimmt.

Das Resultat ist in Abb. 14 B dargestellt. Die Enzymaktivität ist in nmol $\times$ ms $^{-1}$ $\times$ ml Myoplasma $^{-1}$ angegeben. Die durch die jeweilige PIP_2 -Phospholipase C Aktivität entstehende IP_3 -Konzentration im Myoplasma läßt sich durch Integration der Fläche unter der Kurve bestimmen. Aus Gründen der Übersicht ist in Abb. 14 A, B und C nur der Kurvenverlauf der ersten 15 ms dargestellt. Die Integration wurde für einen Transienten von 50 ms durchgeführt (Abb. 14 C). Die IP_3 -Konzentration erreicht einen Wert von 0,002 μM im schnellen Muskel (Tab. 3). In Tab. 3 wird auch die graphisch nicht dargestellte IP_3 -Konzentration für die einzelne Kontraktion eines langsamen Muskels (Herzmuskel) angegeben. Man erkennt, daß der Wert die gleiche Größenordnung hat, wie im Falle des schnellen Muskels. Das heißt, auch im langsamen Muskel liegt die IP_3 -Akkumulation im Myoplasma deutlich unter der bisher angenommenen Reizschwelle für die IP_3 -induzierten Effekte.

3.4.3. Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Akkumulation im Myoplasma eines schnellen Muskels während eines Tetanus

Diese Berechnungen basieren auf einem Computermodell von Cannell und Allen, 1984 (88). Von diesem Modell wurde der Verlauf des Ca^{2+} -Transienten während einer tetanischen Stimulation mit 30 Hz übernommen. Der von Cannell und Allen dargestellte Transient wurde vereinfachend durch folgende Hyperbel beschrieben:

$$\text{Ca}^{2+}(t) = \text{Ca}^{2+}_{\text{ende}} \times (\alpha \times t) / 1 + (\alpha \times t)$$

$\text{Ca}^{2+}(t)$ = Die Ca^{2+} -Konzentration zum jeweiligen Zeitpunkt.

$\text{Ca}^{2+}_{\text{ende}}$ = Die Ca^{2+} -Konzentration am Ende der tetanischen Reizung. Diese Konzentration wird bei längeren Tetani schon vor dem Ende erreicht und bleibt dann konstant. Für die vorliegende Rechnung wurde eine Endkonzentration von 4 μM angenommen.

α = Zeitkonstante für den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. Sie beträgt 0,01 ms^{-1} .

Die Abb. 14 D zeigt den Ca^{2+} -Transienten während einer tetanischen Reizung mit 30 Hz über 4 s. Auch für den Tetanus läßt sich die entsprechende PIP_2 -Phospholipase C Aktivität berechnen (siehe 3.4.1.). Das Ergebnis zeigt Abb. 14 E. Man erkennt, daß das Enzym beinahe während der gesamten Dauer der Reizung aktiv ist. Das durch die PIP_2 -Hydrolyse entstandene IP_3 erreicht eine Konzentration von 1,16 μM . Damit ist gezeigt, daß erst nach einer tetanischen Stimulation des Muskels über 4 s eine IP_3 -Freisetzung erreicht wird, die in der Muskelzelle von Bedeutung sein könnte. Tab. 3 resümiert die Ergebnisse der bisherigen Berechnungen. Aufgeführt sind die IP_3 -Konzentrationen, die während einer einzelnen Kontraktion bzw. eines Tetanus erreicht werden.

1. IP_3 -Konzentration im Myoplasma während einer einzelnen Muskelkontraktion	
Ca^{2+} -Transient	IP_3 -Konzentration in μM
schnell	0,002
langsam	0,009

2. IP_3 -Konzentration im Myoplasma während eines Tetanus	
Tetanusdauer in s	IP_3 -Konzentration in μM
1	0,260
2	0,557
4	1,160
10	2,650

Tab. 3: IP_3 -Akkumulation im Myoplasma bedingt durch die Aktivität der PIP_2 -Phospholipase C während des Ca^{2+} -Transienten.

Diese Tabelle listet die errechneten Werte auf, die zum Teil in Abb. 14 graphisch dargestellt sind.

In Teil 1 ist zusätzlich zu dem Ergebnis der Berechnungen für den schnellen Muskel auch das Resultat für den langsamen Muskeltyp (Herzmuskel) aufgeführt. Die im zweiten Teil der Tabelle angegebenen IP_3 -Konzentrationen sind nur für den schnellen Muskel berechnet, weil der Herzmuskel nicht tetanisierbar ist.

Die Angaben zur Rechnung befinden sich im Text.

3.4.4. Berechnung der Inositol-1,4,5-trisphosphat Produktion während eines Aktionspotentials

Bisher wurde die Aktivierung der PIP_2 -Phospholipase C während des Ca^{2+} -Transienten betrachtet. Die Enzymaktivität ist dabei das Resultat einer Stimulierung durch vorher freigesetztes Ca^{2+} . Falls IP_3 der chemischer Transmitter der elektromechanischen Kopplung ist, stellt sich die Frage, ob die PIP_2 -Phospholipase C durch die Depolarisation der Plasmamembran so aktiviert werden kann, daß ausreichend IP_3 ent-

steht, um anschließend Ca^{2+} aus dem SR freizusetzen. Die Ca^{2+} -Freisetzung wäre in diesem Fall die Folge der PIP_2 -Phospholipase C-Aktivierung.

Die Berechnung basiert auf folgenden Annahmen:

- Die IP_3 -Konzentration, die eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR induzieren kann, wird mit $10 \mu\text{M}$ angenommen (100).
- Die Dauer des Aktionspotentials beträgt 2,5 ms.
- Die PIP_2 -Phospholipase C wird durch das Aktionspotential selbst in Gegenwart von Mg^{2+} und in Abwesenheit von Ca^{2+} maximal aktiviert. Außerdem wird angenommen, daß es bei beginnender Depolarisierung der T-tubuli ohne zeitliche Verzögerung zur Aktivierung des Enzyms kommt.
- IP_3 -katabolisierende Prozesse werden nicht brücksichtigt.
- Als maximale potentielle PIP_2 -Phospholipase C-Aktivität wurde $60 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ Myoplasma gemessen und in die Rechnung eingesetzt.

Das Ergebnis ist in Tab. 4 zusammengefaßt.

Man erkennt, daß die Enzymaktivität 4000-fach höher sein müßte, um eine IP_3 -Konzentration von $10 \mu\text{M}$ im Myoplasma zu erreichen. Die daraus resultierende hypothetische Enzymaktivität von $240000 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ ist bisher noch in keinem Gewebe gemessen worden. Wenn man annimmt, die benötigte IP_3 -Konzentration müsse nur in dem Spalt zwischen T-tubuli und terminalen cisternae erreicht werden, würde unter den angegebenen Voraussetzungen eine mindestens 4-fache PIP_2 -Phospholipase C Stimulierung ausreichen.

	nM
IP ₃ -Produktion während eines Aktionspotentials (2,5 ms)	2,5
	nmol x min ⁻¹ x ml ⁻¹ Myoplasma
Maximale potentielle Phospholipase C-Aktivität in T-tubuli	60
Benötigte Phospholipase C-Aktivität für die Entstehung von 10 µM IP ₃ im Myoplasma	240000
Benötigte Phospholipase C-Aktivität für die Entstehung von 10 µM IP ₃ im Spalt zwischen den Membranen (1/1000 des Myo- plasmas)	240

Tab. 4: Berechnung zur möglichen IP₃-Bildung als Folge der Stimulierung der PIP₂-Phospholipase C durch ein Aktionspotential. Die Berechnung, daß das Volumen des junctional gap nur 1/1000 des Myoplasmas beträgt, basiert auf Daten von Mobley und Eisenberg, 1975 (101).

3.4.5. Zeitdauer bis zum Erreichen einer Inositol-1,4,5-trisphosphat Konzentration von $10 \mu\text{M}$ im Spalt zwischen den Membranen der Triaden

Zusätzlich zu 3.4.3. soll berechnet werden, wie lange es dauern würde, bis eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ IP_3 im junctional gap erreicht ist. Dabei wird die maximale PIP_2 -Phospholipase C Aktivität von $30 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg T-tubuli}^{-1}$ zu Grunde gelegt. Es werden die gleichen Prämissen, wie unter 3.4.3. vorausgesetzt. Die Rechnung basiert auf Daten über die T-tubuli und den Spaltraum von Mobley und Eisenberg, 1975 (101).

Die Breite des Spaltes beträgt 15 nm . Pro μm^2 T-tubuli Membran beträgt das Volumen des Spaltes $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m} \times 0,015 \mu\text{m}^3 = 15 \times 10^{-12} \mu\text{l}$. Da aber nur ca. 70% der T-tubuli-Oberfläche Triaden bildet, muß der Wert auf

$$10 \times 10^{-12} \mu\text{l} / \mu\text{m}^2 \text{ T-tubuli}$$

reduziert werden.

Welche Menge IP_3 muß freigesetzt werden, um eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ in dem junctional gap zu erreichen?

$$\begin{aligned} & 10 \mu\text{M} \times 10 \times 10^{-12} \mu\text{l Volumen} / \mu\text{m}^2 \text{ T-tubuli} \\ & = 10^{-10} \text{ pmol IP}_3 / \mu\text{m}^2 \text{ T-tubuli} \end{aligned}$$

Wieviel μm^2 T-tubuli sind in der Muskelzelle vorhanden?

$$15 \mu\text{m}^2 \text{ T-tubuli} / 100 \mu\text{m}^3 \text{ Muskel (} = 10^{-7} \mu\text{l)}$$

Davon 70%:

$$10 \mu\text{m}^2 \text{ T-tubuli} / 10^{-7} \mu\text{l Muskel}$$

Zur Vereinfachung der weiteren Rechnung wird die spezifische PIP_2 -Phospholipase C Aktivität in Aktivität pro μl Muskelzelle umgerechnet. Bei einem Anteil von 0,1% T-tubuli in der Muskelzelle ergibt sich:

$$\frac{30 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg T-tubuli}^{-1}}{30 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{l Muskelzelle}^{-1}}$$

Dieser Wert wird mit dem Verhältnis von Muskelzellenvolumen / Oberfläche T-tubuli multipliziert. Daraus resultiert folgende Aktivitätsangabe:

$$6 \times 10^{-9} \text{ pmol} \times \text{s}^{-1} \times \mu\text{m}^2 \text{ T-tubuli}^{-1}$$

Hätte die PIP_2 -Phospholipase C diese Aktivität, dann würden unter den angegebenen Bedingungen 16,6 ms benötigt, um 10^{-10} pmol PIP_2 zu hydrolysieren, so daß 10 μM IP_3 im Spalt vorhanden sind. Wenn diese Menge IP_3 während der 2,5 ms des Aktionspotentials freigesetzt werden sollte, müßte die gemessene PIP_2 -Phospholipase C Aktivität ca. 6fach erhöht sein.

3.5. Aktivitäten der PI-metabolisierenden Enzyme in den T-tubuli

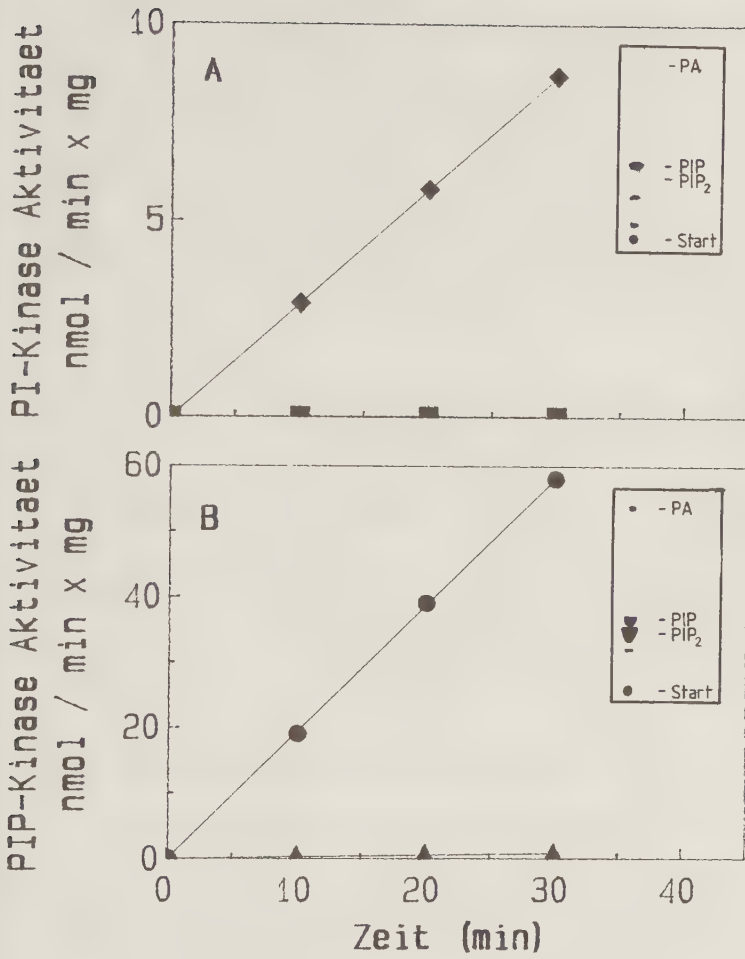
Im Zusammenhang mit der Frage nach der Bedeutung des PI-Stoffwechsels in den Kaninchenskelettmuskelfmembranen sind auch die Aktivitäten der PI-Kinase und PIP-Kinase von Interesse. Die gemessenen Enzymaktivitäten werden vorgestellt und unter dem Aspekt betrachtet, wieviel PIP_2 während des Ca^{2+} -Transienten im Muskel nachgebildet werden kann.

3.5.1. Aktivität der PI-Kinase und PIP-Kinase in den T-tubuli

Die T-tubuli sind die einzige Membranfraktion, die PI-Kinase und PIP-Kinase Aktivitäten aufweisen (siehe Abb. 9). Abb. 15 zeigt, daß die Enzymaktivität durch Zugabe von Substrat gesteigert werden kann, obwohl in den Membranen ausreichend endogenes PI bzw. PIP vorhanden ist (siehe Tab. 3).

Man erkennt, daß die Inkubation der Membranen mit ATP/Mg^{2+} ohne Zugabe von exogenem Substrat nur zu einer geringen Phosphorylierung der in den Membranen vorhandenen Lipiden führt. Erst nach Zugabe von PI bzw. PIP erfolgt die Phosphorylierung zu PIP bzw. PIP_2 . Die in Gegenwart von exogenem Substrat bestimmten spezifischen Enzymaktivitäten ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) betragen 0,3 für die PI-Kinase und 2,0 für die PIP-Kinase.

In Gegenwart von exogenem Substrat im Testansatz ließen sich die PI-Kinase und PIP-Kinase Aktivitäten nachweisen, aber wie die Dünnschichtchromatographie zeigt, erfolgte keine weitere Metabolisierung des entstandenen PIP bzw. PIP_2 . Es entsteht keine Phosphatidsäure, das Produkt der Diacylglycerol-Phosphorylierung. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß unter den gewählten Testbedingungen die PIP_2 -Phospholipase C nicht aktiv ist.



Legende zu Abb. 15 siehe nächste Seite.

Abb. 15: Die PI-Kinase und PIP-Kinase Aktivität in den T-tubuli.

Die Enzymaktivitäten wurden gemessen, wie in 2.2.5. beschrieben ist. Die (A) PI-Kinase Aktivitäten und (B) PIP-Kinase Aktivitäten wurde in (◆, ●) Gegenwart oder (■, ▲) Abwesenheit von exogenem Substrat bestimmt. Die T-tubuli wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml im Testansatz eingesetzt. Wenn die Enzymaktivitäten in Gegenwart von exogenem Substrat durchgeführt wurde, erfolgte anschließend eine Produktidentifizierung. Die phosphorylierten Lipide wurden dazu extrahiert, eingeengt und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (siehe 2.2.7.). Nach der Autoradiographie erfolgte die Identifizierung der Lipide anhand der Standardsubstanzen (siehe 2.2.7.). Das Ergebnis ist in dem jeweiligen Fenster zu sehen.

3.5.2. PIP- und PIP₂-Nachbildung während eines Ca²⁺-Transienten einer einzelnen Kontraktion

Auf Grund der gezeigten Ca²⁺-Abhängigkeit der PIP₂-Phospholipase C wird PIP₂ nur in der Phase des Ca²⁺-Transienten hydrolysiert. Auch wenn berechnet werden konnte, daß das Enzym nicht aktiv genug ist, um 10 µM IP₃ zu produzieren, ist die Betrachtung der PI- und PIP-Kinase Aktivität während dieser Phase interessant.

Die Voraussetzungen für die Rechnung sind:

- Die optimalen PI- und PIP-Kinase Aktivitäten sind auf die Aktivität bei physiologischer Mg²⁺-Konzentration (1 mM) reduziert.
- Die Aktivität der Enzyme wird durch die steigende Ca²⁺-Konzentration nicht verändert.
- Die Enzyme sind Substrat-gesättigt (siehe Tab. 2)
- Die Dauer eines durchschnittlichen Ca²⁺-Transienten in einem schnellen Muskel wird mit 33 ms angenommen.

a) PI-Kinase Aktivität

$$\begin{aligned}
 & 0,15 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Muskel}^{-1} \\
 & = 0,25 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Myoplasma}^{-1} \\
 & = 0,14 \text{ pmol} \times 33 \text{ ms}^{-1} \times \text{ml Myoplasma}^{-1} \\
 & = 0,14 \text{ nM PIP entstehen während des Transienten}
 \end{aligned}$$

b) PIP-Kinase Aktivität

$$\begin{aligned}
 & 0,8 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Muskel}^{-1} \\
 & = 1,37 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Myoplasma}^{-1} \\
 & = 0,75 \text{ pmol} \times 33 \text{ ms}^{-1} \times \text{ml Myoplasma}^{-1} \\
 & = 0,75 \text{ nM PIP}_2 \text{ entstehen während des Transienten}
 \end{aligned}$$

Aus Tab. 3 war ersichtlich, daß während einer Einzelkontraktion eines schnellen Muskels 2 nM PIP₂ hydrolysiert werden. Die hier dargestellte Rechnung zeigt, daß während eines Ca²⁺-Transienten annähernd soviel PIP₂ nachgebildet wird, wie von der PIP₂-Phospholipase C hydrolysiert wird.

Auf Grund der in den Membranen vorhandenen PIP₂-Konzentration von 8,1 mM tritt auch im Falle eines Tetanus bei maximaler PIP₂-Phospholipase C Aktivität eine PIP₂-Verarmung erst nach 290 min ein, obwohl die Bildung von PIP₂ relativ langsam erfolgt.

3.5.2. Vergleich der Aktivitäten der PI-metabolisierenden Enzyme in den Skelettmuskel-T-tubuli mit anderen Systemen

Die dargestellten Aktivitäten der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP₂-Phospholipase C lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß der PI-Stoffwechsel im Skelettmuskel an der elektromechanischen Kopplung beteiligt ist. Bevor man die mögliche physiologische Bedeutung des PI-Metabolismus in den Skelettmuskelmembranen diskutieren kann, muß die Frage geklärt werden, ob die in Skellettmuskelmembranen gemessenen Enzymaktivitäten von denen in anderen Geweben abweichen. In Tab. 5 werden die Aktivitäten verglichen.

	PI Kinase	PIP Kinase	Phospholipase C
	nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹		
Gehirn- Homogenat (102)	0,122	1,600	8,0
Rattenleber- Mikrosomen (103)	0,164	0,014	56,2
Nieren- Mikrosomen (104)	0,009	0,017	n.b.
Skelettmuskel- T-tubuli	0,3	2,0	30

Tab. 5: Ein Vergleich der Aktivitäten der PI-metabolisierenden Enzyme in verschiedenen Geweben.

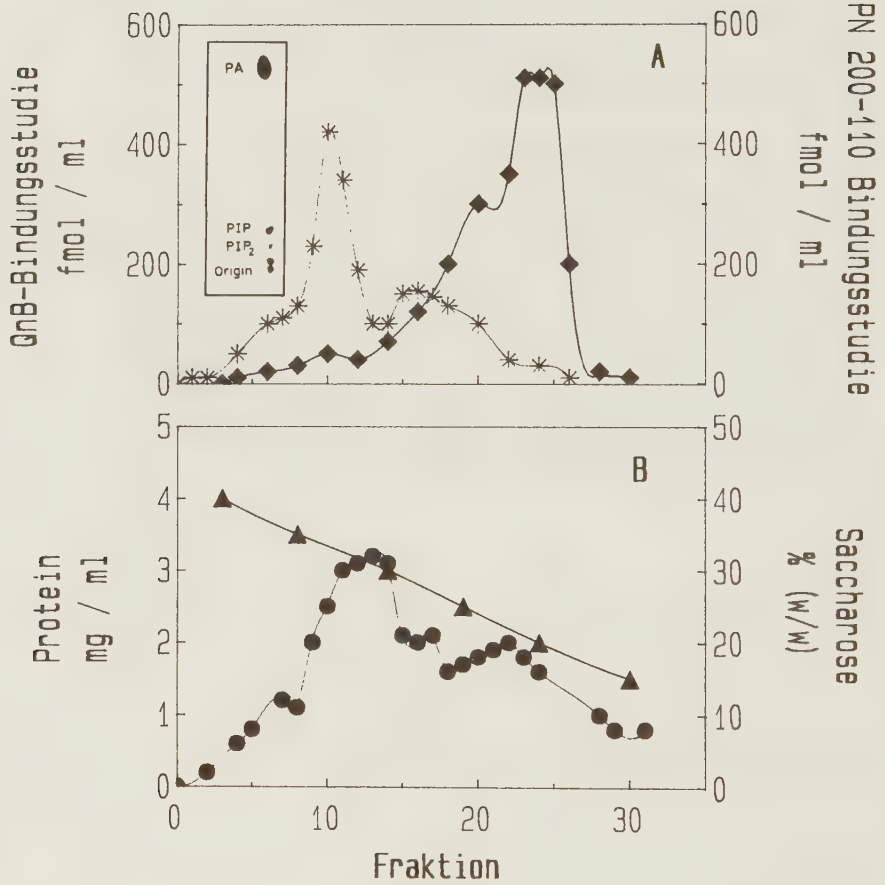
Aufgeführt sind die unter optimalen Testbedingungen gemessenen Enzymaktivitäten. Diese Bedingungen sind abhängig von dem untersuchten Gewebe, aber die Unterschiede sind nur gering. (n.b. = Enzymaktivität nicht bestimmt)

Aus dem Vergleich der Enzymaktivitäten wird ersichtlich, daß die in den T-tubuli vorhandenen Enzymaktivitäten denen in anderen Systemen entsprechen. Somit kann man davon ausgehen, daß den in dieser Arbeit vorgestellten Berechnungen (z.B. zur IP₃-Produktion) keine untypisch kleinen Enzymaktivitäten zu Grunde liegen.

- 3.6. Vergleich der Lipidphosphorylierung in Plasmamembranen aus Kaninchenventrikeln mit Skelettmuskel-T-tubuli
- 3.6.1. Auftrennung von Herzmuskelmikrosomen in Dyaden und freie Plasmamembranen

Die isolierten Herzmuskelmikrosomen werden durch isopyknische Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten in Dyaden und freie Plasmamembranen aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abb. 16 zu sehen.

Die Membranen wurden durch die Bindungsstudien mit den Liganden PN 200-110 und QnB identifiziert (80). Die den Triaden im Skelettmuskel entsprechenden Dyaden waren bei ca. 33% Saccharose lokalisiert. Ein zweiter Proteingipfel bei ca. 20% Saccharose war durch die QnB-Bindungsstellen charakterisiert, d.h. er enthielt die freien Plasmamembranen (engl.: nonjunctional plasmamembran).



Legende zu Abb. 16 siehe nächste Seite.

Abb. 16: Auftrennung der Herzmikrosomen in Dyaden und Plasmamembranen.

10 mg Mikrosomen, die aus zwei Kaninchenherzen gewonnen wurden (siehe 2.1.3.), sind auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (Vol.: 17 ml) aufgetragen worden. Nach der Zentrifugation (15 h bei 45000 x g) wurde der Dichtegradient fraktioniert (0,5-0,8 ml/Fraktion), und auf folgende Parameter untersucht:

- (●) Proteinkonzentration (siehe 2.2.11.)
- (✱) PN 200-110 -Bindungsstudie (siehe 2.2.3.)
- (◆) QnB-Bindungsstudie (siehe 2.2.2.)
- (▲) Saccharose-Konzentration (siehe 2.2.12.)

Die Fraktionen 22-26, die die Plasmamembranen enthielten, wurden gesammelt. Anschließend wurden sie ohne Zugabe von exogenem Substrat mit ^{32}P -ATP/ Mg^{2+} inkubiert (siehe 2.2.5.).

Das Ergebnis der Produktidentifizierung ist in dem Fenster in Teil **A** dargestellt. Es zeigt die mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie getrennten Lipide nach der Autoradiographie (siehe die Methoden 2.2.6. und 2.2.7.).

3.6.2. Phosphorylierung der Phosphoinositide in den Herzmuskelmembranen nach Inkubation mit ATP/ Mg^{2+}

Nach der Auftrennung der Mikrosomen in Dyaden und Plasmamembranen wurden die Membranen mit ATP/ Mg^{2+} inkubiert. Die Bedingungen des Testansatzes waren mit denen für Skelettmuskelmembranen identisch.

In den Dyaden war nach Inkubation mit ATP/ Mg^{2+} keine Phosphorylierung der Membranlipide nachweisbar (nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der freien Plasmamembranen mit ATP/ Mg^{2+} zur Bildung von ^{32}P -Phosphat markiertem PIP und PIP₂ und zur Entstehung von Phosphatidsäure (die Produktidentifizierung ist im Fenster der Abb. 16 gezeigt). Das deutet darauf hin, daß wie im Skelettmuskel PI- und PIP-Kinase und DG-Kinase sowie PIP₂-Phospholipase C in den Membranen vorhanden sind. Im Unterschied zu den Skelettmuskelmembranen mußte kein Substrat zugegeben werden, um die PI-Kinase oder PIP-Kinase zu aktivieren. Die Produktidentifizierung zeigte, daß in den Herzmuskelmembranen ca. 80% des inkorporierten ^{32}P -Phosphates als

Phosphatidsäure vorlag. Das deutet außerdem auf eine relativ große PIP_2 -Phospholipase C Aktivität hin.

4. DISKUSSION

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Tatsache, daß IP_3 im Skelettmuskel als sekundärer Botenstoff wirkt. Unabhängig von der vorrangigen Funktion des IP_3 muß man deshalb erwarten, daß die Enzyme, die an der Entstehung des IP_3 aus PI beteiligt sind, in den Skelettmuskelmembranen vorhanden sind.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß in isolierten Skelettmuskelmembranen PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C direkt nachweisbar sind. Ein Vergleich der Enzymaktivitäten mit anderen Geweben macht deutlich, daß der PI-Stoffwechsel im Skelettmuskel die gleiche Größenordnung hat und folglich auch die gleiche Bedeutung haben könnte.

Es wird allgemein angenommen, daß die Enzyme des PI-Stoffwechsels in den Plasmamembranen der jeweiligen Gewebe lokalisiert sind. Im Falle des Skelettmuskels konnte aber z.B. die Präsenz der PI-Kinase auch im SR gezeigt werden (105). Angaben zur Lokalisation der Enzyme in der Muskelzelle setzen voraus, daß die Mikrosomen in Subfraktionen aufgetrennt werden, die eindeutig identifiziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit ist die Trennung der Skelettmuskelmikrosomen in Triaden, leichtes SR, terminale cisternae und T-tubuli dargestellt. In dem leichten SR ist nur die PI-Kinase nachweisbar, was im Einklang mit früheren Resultaten ist, denen zu Folge es im SR zur Bildung von PIP, aber nicht zu einer weiteren Phosphorylierung kommen kann (siehe Einleitung). Die Entstehung von PIP_2 war bisher nur in den T-tubuli nachgewiesen worden. In Übereinstimmung damit sind PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C nur in den T-tubuli gemeinsam vorhanden.

Die Lokalisation der PI-metabolisierenden Enzyme in den T-tubuli führt zu der Frage nach der Funktion des PI-Stoffwechsels für die Muskelzelle. Wie schon erwähnt, wird diskutiert, daß die Depolarisation der T-tubuli-Membran zu einer Hydrolyse des PIP_2 führt, und das entstandene IP_3 die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR induziert.

Der potentiellen Aktivität der PIP_2 -Phospholipase C kommt in dieser Hypothese eine zentrale Bedeutung zu. Das Enzym konnte im Rahmen dieser Arbeit wie folgt charakterisiert werden :

- Die PIP_2 -Phospholipase C ist $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängig.
- Das pH-Optimum liegt bei pH 6,7.
- Es handelt sich um ein peripheres Membranprotein.
- Die maximale Enzymaktivität beträgt $60 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml} \text{ Myoplasma}^{-1}$.

Im Ergebnisteil ist dargestellt, daß eine PIP_2 -Hydrolyse erst bei einer Ca^{2+} von mehr als $0,1 \mu\text{M}$ nachweisbar war. Die Ca^{2+} -Konzentration in einer Muskelzelle beträgt bis zum Ca^{2+} -Transienten aber nur 60 nM . Das bedeutet, daß die PIP_2 -Phospholipase C im Ruhezustand der Muskelzelle nicht aktiv ist. Falls ein Aktionspotential zu einer maximalen Aktivierung des Enzyms führen würde, käme es zu einer IP_3 -Akkumulation von $2,5 \text{ nM}$ im Myoplasma (Tab. 4). Um eine IP_3 -Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zu erreichen, müßte das Enzym viertausend-fach aktiver sein, d.h. eine Aktivität von $240000 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ aufweisen. Diese Berechnung basiert darauf, daß die gemessene Enzymaktivität in vitro wirklich der maximalen potentiellen PIP_2 -Hydrolyse in vivo entspricht.

Alternativ dazu ließ sich berechnen, daß eine PIP_2 -Phospholipase C Aktivität von $240 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ ausreichen würde, um eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ IP_3 im junctional gap zu erreichen. Ein ähnliches Resultat lieferte die Berechnung der Dauer bis zum Erreichen von $10 \mu\text{M}$ IP_3 in dem Spalt zwischen den Membranen. Demnach müßte die Enzymaktivität ca. 6fach höher sein, als die gemessene maximale PIP_2 -Hydrolyserate. In beiden Rechnungen sind IP_3 -katabolisierende Prozesse und die Diffusion des IP_3 aus dem Spalt nicht berücksichtigt. Das bedeutet, daß die Enzymaktivitäten, die nötig wären, um eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ IP_3 zu erreichen, noch größer sein könnten.

Man kann diskutieren, ob die angenommene Reizschwelle von $10 \mu\text{M}$ für eine IP_3 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung nicht zu hoch sei. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Sensitivität der Muskelzelle für IP_3 reguliert werden kann und unter bestimmten Umständen auch eine geringere IP_3 -Konzentration eine Wirkung hätte. Es ist z.B. bekannt, daß die IP_3 -Bindung an die Rezeptoren in Membranen aus dem Ratten-Cerebellum durch eine pH-Änderung beeinflusst wird (41). Aber bisher gibt es keinen Hinweis darauf, daß IP_3 -Effekte in vitro mit weniger als $10 \mu\text{M}$ erzielt werden können.

Auch die bisher beschriebenen Effekte des IP_3 im Kaninchenskelettmuskel (Sensitivierung des kontraktiven Apparates und Freisetzung der Aldolase) setzen eine IP_3 -Konzentration von mehr als $10 \mu M$ voraus. Die dargestellten Rechnungen zeigen, daß die Involvierung des IP_3 in die elektromechanische Kopplung unwahrscheinlich ist, wenn man annimmt, auch für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR seien mindestens $10 \mu M$ IP_3 notwendig.

Als einziger Aktivator der PIP_2 -Phospholipase C konnte Ca^{2+} nachgewiesen werden. Doch nur während eines Ca^{2+} -Transienten wird eine Ca^{2+} -Konzentration in der Muskelzelle erreicht, die das Enzym aktiviert. Die Berechnungen ergaben, daß es während einer Einzelkontraktion zu einer IP_3 -Akkumulation im Myoplasma von $2 nM$ (beim langsamen Muskel $9 nM$) und während eines Tetanus ($4 s$) zu einer IP_3 -Konzentration von $1,16 \mu M$ kommen kann. Daraus folgt, daß nur der Tetanus zu einer IP_3 -Akkumulation führen kann, deren Größenordnung eine Beteiligung an der Regulation der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktiven Apparates oder der Kompartimentierung der Aldolase möglich werden läßt.

Auf Grund der Bedeutung des IP_3 für die Muskelzelle war es interessant, die Bedingungen der IP_3 -Bildung weiter zu untersuchen, auch wenn es keinen Hinweis auf eine Involvierung an der elektromechanischen Kopplung gibt. Es wurde schon erwähnt, daß in vielen Geweben die Aktivierung eines α -adrenergen oder muskarinergen Rezeptors via G-Protein zu einer Stimulation der PIP_2 -Hydrolyse führt. Die G-Proteine G_s , G_i und G_o wurden in Skelettmuskelmembranen schon früher nachgewiesen (106). Das hauptsächlich in den T-tubuli lokalisierte G_s ist an der Regulation des Adenylat-Cyklase Systems beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Beeinflussung der PIP_2 -Phospholipase C Aktivität durch $GTP \gamma S$ oder GTP gezeigt werden. Die in den T-tubuli vorhandenen G-Proteine sind wahrscheinlich nicht an der Regulation der PIP_2 -Hydrolyse beteiligt. Im Zusammenhang damit steht auch das Ergebnis, daß die Inkubation der Skelettmuskelmembranen mit adrenergen oder muskarinergen Agonisten die PIP_2 -Phospholipase C Aktivität nicht beeinflusst. Außerdem konnten keine Bindungsstellen des an die Muskarin-Rezeptoren bindenden Liganden QnB nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß es unwahrscheinlich ist, daß einer der genannten Agonisten die IP_3 -Entstehung regulieren kann.

In der Einleitung wurde schon darauf hingewiesen, daß eine Phosphorylierung der PIP_2 -Phospholipase C im Meerschweinchen-Uterus nachgewiesen wurde (76). Demgegenüber ließ sich die PIP_2 -Phospholipase C in Skelettmuskeltriaden weder durch die Protein Kinase C noch durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein Kinase phosphorylieren (die Versuche sind nicht dargestellt). Damit ist ein Regulationsmechanismus ähnlich der Phosphorylase Kinase Kaskade im Muskel nicht vorstellbar.

Ebensowenig scheint Calmodulin an der Regulation des Enzyms beteiligt zu sein. Die dazu durchgeführten Versuche zeigten, daß die Inkubation der Membranen mit Calmodulin-Antagonisten und einem Calmodulin-Antikörper keine Wirkung auf die PIP_2 -Hydrolyse hatten (im Ergebnisteil nicht dargestellt). In der Literatur wird beschrieben, daß das Profil der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Phospholipase C je nach Substrat (PIP oder PIP_2) variiert (107). Das unterstreicht, daß Calmodulin nicht an der Regulation des Enzyms beteiligt ist.

In der Literatur wird die Möglichkeit der Beeinflussung der PIP_2 -Hydrolyse durch die Konformation des PIP_2 in der Membran diskutiert (108). Dieser Hypothese zu Folge wird durch die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor die Konfiguration des Substrates für die PIP_2 -Phospholipase C verändert. Nur in der Nicht-Bilayer Konfiguration könnte PIP_2 hydrolysiert werden. Im Falle des Skelettmuskels ließ sich kein Agonist nachweisen, der die PIP_2 -Phospholipase C beeinflusst und möglicherweise die Konfiguration des PIP_2 in der Membran verändert. Theoretisch ist es aber denkbar, daß die erwähnte Konformationsänderung der polaren Lipide durch die Depolarisation der Membran induziert werden könnte. Auf diese Weise könnte ein Aktionspotential zur PIP_2 -Hydrolyse führen, so wie es in der Berechnung zur IP_3 -Akkumulation während einer Depolarisation angenommen wurde.

Außer der Regulation durch die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration ließ sich in den Skelettmuskelmembranen kein anderer Kontrollmechanismus zeigen. Daher stellt sich die Frage, ob nicht ein anderes Enzym des PI-Stoffwechsels einer speziellen Regulation unterliegt. Aus Tab. 5 wird ersichtlich, daß die PI-Kinase in den dargestellten Geweben die kleinste Umsatzrate der PI-metabolisierenden Enzyme hat. Das legt die Vermutung nahe, daß die PI-Kinase einer besonderen Kontrolle unterliegt. Diskutiert wird eine Produkthemmung (109) oder eine Inhibierung durch

Adenosin (110). Brockerhoff, 1986 (111) postuliert eine Hormon-Rezeptor-induzierte Kontrolle der PI-Kinase (111). Es scheint aber unwahrscheinlich, daß die Regulation der PI-Kinase im Skelettmuskel für die IP_3 -Entstehung von Bedeutung ist. Die Berechnungen haben gezeigt, daß in den T-tubuli relativ große Konzentrationen der Phosphoinositide bezogen auf die Enzymaktivitäten vorliegen. Deshalb ist die PIP_2 -Hydrolyse nahezu unabhängig von der Nachbildung des Substrates. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Verhältnissen in anderen Geweben, in denen die Stimulierung des PI-Stoffwechsels zu einer Phosphoinositid-Verarmung führt (z.B. Herzmuskel) (57).

Die bisherigen Erkenntnisse über den PI-Stoffwechsel im Kaninchenskelettmuskel sind vereinfachend in Abb. 17 dargestellt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, daß die Inkubation der Triaden bzw. T-tubuli mit ATP/Mg^{2+} nicht zur Entstehung von PIP, PIP_2 und PA führt, obwohl aus Tab. 2 hervorgeht, daß ausreichend Substrat in den Membranen vorhanden ist. In Kaninchenherzmikrosomen entstehen unter den gleichen Bedingungen PIP, PIP_2 und hauptsächlich PA. Dieser Vergleich unterstreicht die Erkenntnis, daß sich der PI-Stoffwechsel im Skelettmuskel von dem in anderen Geweben unterscheidet.

Die geringen PI-Kinase und PIP-Kinase Aktivitäten im Skelettmuskel bei der Verwertung von endogenem Substrat lassen sich möglicherweise durch eine ATP-Verarmung erklären. Neuerdings (Vergara, pers. Mitteilung) gibt es einen Hinweis, daß die Lipidkinase im Skelettmuskel kein cytosolisches ATP, sondern nur das in den Membranen synthetisierte ATP benutzen. Es ist denkbar, daß die verwendeten Triaden und T-tubuli in vitro nicht mehr ausreichend ATP für eine PI- bzw. PIP-Phosphorylierung synthetisieren können. Möglicherweise liegt diese ATP-Verarmung in Herzmuskelmembranen nicht vor oder ist nicht nachweisbar, weil sich mehrere PI-metabolisierende Signaltransduktionen überschneiden. Der PI-Stoffwechsel im Herz erfüllt scheinbar mehrere Funktionen. Darauf deutet die mögliche Aktivierung des PI-Stoffwechsels sowohl durch α -adrenerge als auch durch muskarinerge Agonisten hin.

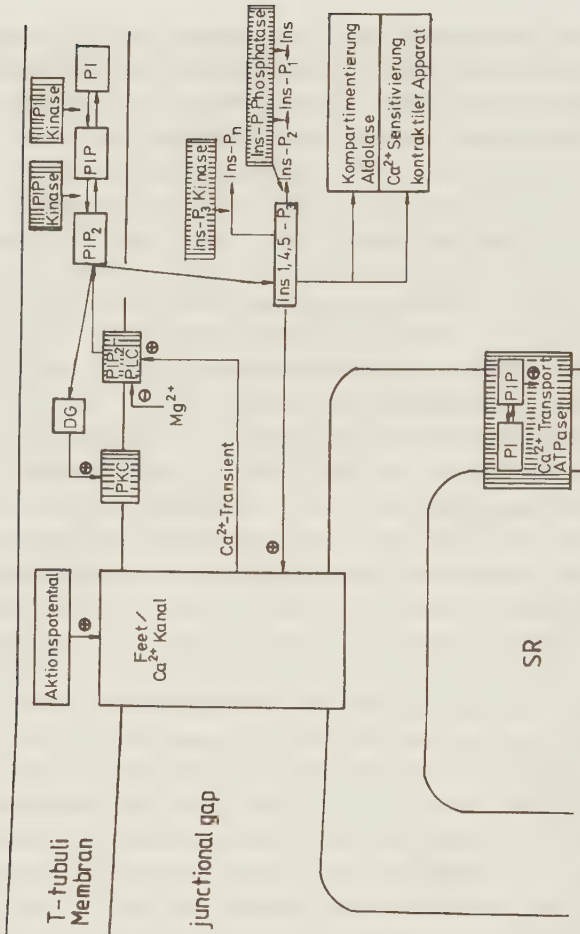


Abb. 17: Schematische Darstellung des PI-Stoffwechsels im Kaninchenskelettmuskel unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Man erkennt die Kontaktstelle zwischen T-tubuli-Membran und SR. Im Unterschied zur Darstellung des PI-Stoffwechsels in Abb. 1 ist kein Rezeptor und kein G-Protein in die Regulation der PIP_2 -Phospholipase C involviert. Die Enzymaktivität wird allein durch die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration in der Muskelzelle beeinflusst.

Wenn man Triaden oder T-tubuli in Gegenwart von PI bzw. PIP mit ATP/Mg^{2+} inkubiert, entstehen zwar PIP bzw. PIP_2 , aber kaum PA. Das deutet darauf hin, daß die PIP_2 -Phospholipase C unter diesen Bedingungen nicht aktiv ist. Ein Vergleich der Testbedingungen für die Lipidkinasen (siehe 2.2.5) und die PIP_2 -Phospholipase C (siehe 2.2.1.) zeigt große Differenzen im pH-Optimum und bei der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit. Es ist nicht vorstellbar, daß es Testbedingungen gibt, bei denen Lipidkinasen und PIP_2 -Phospholipase C gleichzeitig aktiv sind. Das unterstreicht die Vermutung, daß die PIP_2 -Hydrolyse in vivo nicht unbedingt eine sofortige PIP_2 -Nachbildung aus PI erfordert.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich der PI-Stoffwechsel im Skelettmuskel von dem in Nicht-Muskelzellen deutlich unterscheidet. Es gibt keinen Hinweis, daß der PI-Metabolismus in die elektromechanische Kopplung involviert sein könnte. Seine vorrangige physiologische Bedeutung bleibt damit weiterhin ungeklärt, auch wenn man weiß, daß IP_3 in der Muskelzelle die Sensitivität des kontraktile Apparates für Ca^{2+} erhöht und die Kompartimentierung der Aldolase beeinflußt. Die Bedeutung des IP_3 liegt vielleicht in seiner Rolle als Substrat für die Phosphorylierung zu höheren Inositolphosphaten, die ihrerseits Ionenkanäle in der Plasmamembran regulieren können.

Alternativ dazu läßt die hohe Konzentration an PI, PIP und PIP_2 in der T-tubuli auch die Möglichkeit offen, daß einem dieser Phosphoinositide eine spezielle Aufgabe zukommt. In einigen Nicht-Muskelzellen (z.B. in menschlichen Blutplättchen) (112) ist der PI-Stoffwechsel an der Polymerisation von Aktin beteiligt. Durch die Bindung von PIP_2 an den Profilaktin-Komplex kommt es zur Dissoziation. Das freigesetzte Aktin polymerisiert in vivo sofort. IP_3 und DG haben keine Wirkung auf die Polymerisation. Es ist gut vorstellbar, daß der PI-Stoffwechsel auch in der Muskelzelle einen Einfluß auf die Bildung der Mikrofilamente hat.

Außerdem ist es denkbar, daß den PI-metabolisierenden Enzymen in der Phase des Zellwachstums eine besondere Bedeutung zukommt. Es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Wachstumsfaktoren einen erhöhten PI-Stoffwechsel in den Membranen zur Folge haben (113;114;115). Vielleicht sind einige Funktionen der sekundären Botenstoffe IP_3 und DG in der ausgewachsenen und ausdifferenzierten Muskelzelle nicht mehr nachweisbar.

Weiter Versuche müssen die noch offenen Fragen zum PI-Stoffwechsel im Kaninchenskelettmuskel klären. So ist z.B. ungeklärt, weshalb sich in Muskelzellen des EDL und des Soleusmuskels eine IP_3 -Konzentration in der Größenordnung μM (Dr. G.W. Mayr und Dr. R. Thieleczek, pers. Mitteilung) nachweisen läßt, obwohl die PIP_2 -Phospholipase C auf Grund ihrer Ca^{2+} -Abhängigkeit im Ruhezustand der Zelle nicht aktiv sein kann. Außerdem ist zu untersuchen, ob es Prozesse gibt, die zu einer gesteigerten Sensibilität der Zelle für IP_3 führen, und die Reizschwelle für IP_3 -induzierte Effekte senken.

Auch die Suche nach bisher unbekannten Agonisten und Rezeptoren, die in der Muskelzelle den PI-Stoffwechsel beeinflussen können, wäre interessant.

Zur Klärung der Rolle des PI-Stoffwechsels für das Wachstum der Zelle sind Versuche mit prä- oder neonatalen Muskelzellen vorstellbar.

Von großer Wichtigkeit ist die Erforschung der Bedeutung der höher phosphorylierten Inositolphosphate.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mikrosomen aus Kaninchenskelettmuskulatur lassen sich durch eine isopyknische Zentrifugation in einem linearen Saccharosegradienten in freies SR und Triaden auftrennen. Die Triaden werden in einer French Press einem Druck von $5,3 \times 10^7$ Pa ausgesetzt, so daß die terminalen cisternae von den T-tubuli abgetrennt werden. Die Auftrennung der Membranen erfolgt durch eine erneute isopyknische Zentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten. Anhand von Bindungsstudien mit den Liganden PN 200-110 und Ouabain lassen sich die Membranfraktionen eindeutig identifizieren.

Die Verteilung der PI-Kinase, PIP-Kinase und PIP_2 -Phospholipase C zeigte, daß diese Enzyme nur in den T-tubuli gemeinsam lokalisiert sind. Im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung des IP_3 für die elektromechanische Kopplung wurde die PIP_2 -Phospholipase C näher charakterisiert. Das Enzym ist ein $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängiges, peripheres Membranprotein mit einem pH-Maximum bei pH 6,7. Die maximale PIP_2 -Hydrolyserate beträgt $60 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml Myoplasma}^{-1}$. Es konnte kein Agonist nachgewiesen werden, der die Enzymaktivität beeinflusst. Ebenso wenig gibt es einen Hinweis auf eine Regulation der PIP_2 -Phospholipase C durch ein G-Protein.

Die theoretisch mögliche IP_3 -Akkumulation während eines Aktionspotentials wurde mit 2,5 nM berechnet. Damit ist eine Funktion des IP_3 als chemischer Transmitter der elektromechanischen Kopplung unwahrscheinlich.

Die IP_3 -Entstehung während eines Ca^{2+} -Transienten einer einzelnen Kontraktion liegt in der gleichen Größenordnung. Nur während einer tetanischen Stimulation über 4 s wird mit $1,16 \mu\text{M}$ eine IP_3 -Konzentration im Myoplasma erreicht, welche die Kraftentwicklung des Muskels oder die Kompartimentierung der Aldolase beeinflussen könnte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ENDO, M. (1977): *Physiol. Rev.* 57, 71-108
- 2) HUXLEY, A.F. and TAYLOR, R.E. (1955): *Nature* 176, 1068-1074
- 3) CONSTANTIN, L.L. (1970): *J. Gen. Physiol.* 55, 703-715
- 4) CORAY, A.; FRY, C.H.; HESS, G.; McGUIGAN, J.A.S. and WEINGART, R. (1980): *J. Physiol.* 305, 60-67
- 5) MARTONOSI, A.N. (1984): *Physiol. Rev.* 64, 1240-1320
- 6) NAGASAKI, K. and KASAI, M. (1983): *J. Biochem.* 94, 1101-1109
- 7) INUI, M.; SAITO, A. and FLEISCHER, S. (1987): *J. Biol. Chem.* 262, 1740-1747
- 8) INUI, M.; SAITO, A. and FLEISCHER, S. (1987): *J. Biol. Chem.* 262, 15637-15642
- 9) CAILLE, J.; ILDEFONSE, M. and ROUGIER, O. (1985): *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 46, 185-239
- 10) ENDO, M.; TANAKA, M. and EBASHI, S. (1968): *Proc. 24th Intl. Congr. Physiol. Sci.* 7, 126
- 11) FORD, L.E. and PODOLSKY, R.J. (1970): *Science* 167, 58-59
- 12) ENDO, M. (1977): *Physiol. Rev.* 57, 71-108
- 13) MIYAMOTO, H. and RACKER, E. (1981): *FEBS Lett.* 133, 235-238
- 14) KASAI, M. and MIAMOTO, H. (1973): *FEBS Lett.* 34, 299-301
- 15) ENDO, M.; TANAKA, M. and OGAWA, Y. (1970): *Nature* 228, 34-36
- 16) STEPHENSON, E.W. (1978): *J. Gen. Physiol.* 71, 411-430
- 17) HODGKIN, A.L. and HOROWICZ, P. (1960): *J. Physiol.* 153, 370-385
- 18) SCHNEIDER, M.F. and CHANDLER, W.K. (1973): *Nature* 242, 244-246
- 19) MATHIAS, R.T.; LEVIS, R.A. and EISENBERG, R.S. (1980): *J. Gen. Physiol.* 76, 1-31
- 20) HUCHO, F. (1986): *Eur. J. Biochem.* 158, 211-226
- 21) SUNGER, T.; CODINA, J. and BIRNBAUMER, L. (1984): *J. Biol. Chem.* 259, 15447-15451
- 22) BRAND, D.R. and ROSS, E.M. (1985): *J. Biol. Chem.* 260, 266-272

- 23) HOKIN, M.R. and HOKIN, L.E. (1953): J. Biol. Chem. 203, 967-977
- 24) MICHELL, R.H. (1975): Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147
- 25) MAYR, G.W. (1987): Topics in Biochemistry, Boehringer Mannheim, 1-18
- 26) DOWNES, C.P. (1986): Neurochem. Int. 9, 211-230
- 27) OTANI, H.; OTANI, H. and DAS, D.K. (1988): Circ. Res. 62, 8-17
- 28) SCHADEWALDT, P.; STAPPER, N.J. and STAIB, W. (1986): FEBS Lett. 217, 45-48
- 29) SCHIMMEL, R.J.; DZIERZANOWSKI, D.; ELLIOTT, M.E. and HONEYMAN, T.W. (1986): Biochem. J. 236, 757-764
- 30) SCHOEPP, D.D. and RUTLEDGE, C.O. (1985): Biochem. Pharmacol. 34, 2705-2711
- 31) LIANG, M.; MARTIN, M.W. and HARDEN, T.K. (1987): Mol. Pharmacol. 32, 443-449
- 32) BITAR, K.N.; BRADFORD, P.G.; PUTNEY, J.W., Jr. and MAKHLOUF, G.M. (1986): J. Biol. Chem. 261, 16591-16598
- 33) BROWN, J.H. and MASTERS, (1984): Fed. Proc. 43, 2613-2517
- 34) NISHIZUKA, Y. (1984): Nature 308, 693-698
- 35) NISHIZUKA, Y. (1986): Science 233, 305-312
- 36) KRAFT, S.A. and ANDERSON, W.B. (1983): Nature 301, 621-623
- 37) STREB, H.; IRVINE, R.F.; BERRIDGE, M.J. and SCHULZ, I. (1983): Nature 306, 67-69
- 38) BERRIDGE, M.J. and IRVINE, R.F. (1984): Nature 312, 315-321
- 39) HIDALGO, C.; CARRASCO, M.A.; MAGENDZO, K. and JAIMOVICH, E. (1986): FEBS Lett. 202, 69-73
- 40) VOLPE, P.; KRAUSE, K.-H.; HASHIMOTO, S.; ZORZATO, F.; POZZAN, T.; MELDOLES, J. and LEW, D.P. (1988): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1091-1095
- 41) WORLEY, P.F.; BARBAN, J.M.; SUPATTAPONE, S.; WILSON, V. and SNYDER, S.H. (1987): J.Biol. Chem. 262, 12132-12136
- 42) SPÄT, A.; BRADFORD, P.G.; MCKINNEY, J.S.; RUBIN, R.P. and PUTNEY, J.W., Jr. (1986): Nature 319, 514-516

- 43) RYU, S.H.; LEE, S.Y.; LEE, K.-Y. and RHEE, S.G. (1987):
FASEB J. 1, 388-393
- 44) IRVINE, R.F. and MOOR, R.M. (1986): Biochem. J. 240, 917-920
- 45) MORRIS, A.P.; GALLACHER, D.V.; IRVINE, R.F. and
PETERSEN, O.H. (1987): Nature 330, 653-655
- 46) MAYR, G.W. and DIETRICH, W. (1987): FEBS lett. 213, 278-282
- 47) MILANI, D.; VOLPE, P. and POZZAN, T. (1988): Biochem. J. in
Druck
- 48) VARSANYI, M.; MESSER, M.; BRANDT, N.R. and HEILMEYER,
L.M.G., Jr. (1986): Biochem. Biophys. Res. Commun.
138, 1395-1404
- 49) VARSANYI, M.; TÖLLE, M.-G.; HEILMEYER, L.M.G., Jr.;
DAWSON, R.M.C. and IRVINE, R.F. (1983): EMBO J. 2,
1543-1548
- 50) VOLPE, P.; SALVIATI, G.; Di VIRGILIO, F. and POZZAN, T.
(1985): Nature 316, 347-349
- 51) VERGARA, J.; TSIEN, R.Y. and DELAY, M. (1985): Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 82, 6352-6356
- 52) SCHERER, N.M. and FERGUSON, J.E. (1985): Biochem. Biophys.
Res. Commun. 128, 1064-1070
- 53) LEA, T.J.; GRIFFITHS, P.J.; TREGGAR, R.T. and ASHLEY, C.C.
(1986): FEBS Lett. 207, 153-161
- 54) DONALDSON, S. (1988): Proc. Natl. Acad. Sci. USA in Druck
- 55) THIELECZEK, R. and HEILMEYER, L.M.G., Jr. (1986): Biochem.
Biophys. Res. Commun. 135, 662-669
- 56) THIELECZEK, R.; MAYR, G.W. and BRANDT, N.R. (1988): J.
Biol. Chem. zur Veröffentlichung eingereicht.
- 57) POGGIOLI, J.; SULPICE, J.C. and VASSORT, G. (1986): FEBS
Lett. 206, 292-297
- 58) VERGARA, J. and ASOTRA, K. (1987): News Physiol. Sci. 2,
182-186
- 59) Di VIRGILIO, F.; SALVIATI, G.; POZZAN, T. and VOLPE, P.
(1986): EMBO J. 5, 259-262
- 60) WILSON, D.B.; CONNOLLY, T.M.; BROSS, T.E.; MAJERUS,
P.W.; SHERMAN, W.R.; TYLER, A.N.; RUBIN, L.J. and
BROWN, J.E. (1985): J. Biol. Chem. 260, 13496-13501

- 61) RYU, S.H.; SUH, P.-G.; CHO, K.-S.; LEE, K.-Y. and RHEE, S.G. (1987): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6649-6653
- 62) WILSON, D.B.; BROSS, T.E.; HOFMANN, S.L. and MAJERUS, P.W. (1984): J. Biol. Chem. 259, 11718-11724
- 63) BANNO, Y.; NAKASHIMA, S. and NOZAWA, Y. (1986): Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 713-721
- 64) COCKROFT, S. (1987): Trends. Biochem. Sci. 12, 75-78
- 65) COCKROFT, S.; BALDWIN, J.M. and ALLAN, D. (1984): Biochem. J. 221, 477-482
- 66) BALDASSARE, J.J. and FISHER, G.J. (1986): J. Biol. Chem. 261, 11942-11944
- 67) COCKROFT, S. (1987): Trends. Biochem. Sci. 12, 75-78
- 68) SMITH, C.D.; COX, C.C. and SNYDERMAN, R. (1986): Science 232, 97-100
- 69) COCKROFT, S.; BALDWIN, J.H. and ALLEN, D. (1984): Biochem. J. 221, 477-483
- 70) TAYLOR, S.J. and EXTON, J.H. (1987): Biochem. J. 248, 791-799
- 71) BANNO, Y. and NOZAWA, Y. (1987): Biochem. J. 248, 95-101
- 72) DUNLOP, M.E. and LARKINS, R.G. (1986): Biochem. J. 240, 731-737
- 73) LITOSCH, J.; WALLIS, C. and FAIN, J. (1985): J. Biol. Chem. 260, 5464-5471
- 74) COCKROFT, S. and GOMPERTS, B.D. (1985): Nature 314, 534-536
- 75) BLACHIER, F.; SEGURA, M.C. and MALAISSE, W.J. (1987): Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol. 55, 335-355
- 76) BENNETT, C.F. and CROOKE, S.T. (1987): J. Biol. Chem. 262, 13789-13797
- 77) LAU, Y.H.; CASWELL, A.H. and BRUNSCHWIG, J.P. (1977): J. Biol. Chem. 252, 5565-5574
- 78) BRANDT, N. (1985): Arch. Biochem. Biophys. 242, 306-319
- 79) WALSETH, T.F. and JOHNSON, R.A. (1979): Biochim. Biophys. Acta 562, 11-31
- 80) BRANDT, N.R. and BUSSEFF, A.L. (1986): Arch. Biochem. Biophys. 244, 872-875

- 81) FLOCKERZI, V.; OEKEN, H.J.; HOFMANN, F.; PELZER, D.;
CAVALIE, A. and TRAUTWEIN, N.W. (1986): *Nature*
323, 66-68
- 82) SCHACHT, J. (1976): *Meth. Enzymol.* 72, 626-631
- 83) SHAIGK, N.A. and PALMER, F.B.ST.C. (1977): *J. Neurochem.*
28, 395-402
- 84) PENNINGTON, S.R. and MARTIN, B.R. (1985): *J. Biol. Chem.*
260, 11039-11045
- 85) BLIGH, E.G. and DYER, W.J. (1959): *Can. J. Biochem. Physiol.*
37, 911-917
- 86) BERRIDGE, M.J.; DOWNES, C.P. and HANLEY, M.P. (1982):
Biochem. J. 206, 587-595
- 87) ROBERTSON, S.P.; JOHNSON, D.J. and POTTER, J.D. (1981):
Biophys. J. 34, 559-569
- 88) CANNELL, M.B. and ALLEN, D.G. (1984): *Biophys. J.* 45, 913-
925
- 89) BRADFORD, M.M. (1976): *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- 90) SILLEN, M.G. and MARTELL, A.E. (1970): *Spec. Publ. Chem.*
Soc. 25
- 91) ROCK, C.O. and JACKOWSKI, S. (1987): *J. Biol. Chem.* 262,
5492-5498
- 92) MAGNALDO, J.; TALWAR, M.; ANDERSON, W.B. and
POUYSEGUR, J. (1987): *FEBS Lett.* 201, 6-10
- 93) HO, A.K. and KLEIN, D.C. (1987): *J. Neurochem.* 78, 1033-1038
- 94) MELIN, P.M.; SUNDLER, R. and JERGIL, B. (1986): *FEBS Lett.*
198, 85-88
- 95) LITOSCH, I. and FAIN, J.N. (1985): *J. Biol. Chem.* 260, 16052-
16055
- 96) LOW, M.G.; CARROLL, R.C. and WEGGLICKI, W.B. (1987):
Biochem. J. 221, 813-820
- 97) AHNERT-HILGER, G.; BHAKDI, S. and GRATZL, M. (1985): *J.*
Biol. Chem. 260, 12730-12734
- 98) ROSEMBLATT, M.; HIDALGO, C.; VERGARA, C. and IKEMOTO,
N. (1981): *J. Biol. Chem.* 256, 8140-8148
- 99) BAYLOR, S.M.; CHANDLER, W.K. and MARSHALL, M.W.
(1983): *J. Physiol.* 344, 625-666

- 100) NOSEK, T.M.; WILLIAMS, W.F.; ZIEGLER, S.T. and GODT, R.E.
(1986): *Biophys. J.* 49, 191
- 101) MOBLEY, B.A. and EISENBERG, B.R. (1975): *J. Gen. Physiol.*
66, 31-45
- 102) VAN DONGEN, C.J.; ZWIERS, H. and GISPEN, W.H. (1984):
Biochem. J. 223, 197-203
- 103) HARWOOD, J.L. and HAWTHORNE, J.N. (1969): *Biochim.*
Biophys. Acta 171, 75-88
- 104) LUNDBERG, G.A.; JERGIL, B. and SUNDLER, R. (1985):
Biochim. Biophys. Acta 846, 379-387
- 105) SCHÄFER, M.; BEHLE, G.; VARSANYI, M. and HEILMEYER,
L.M.G., Jr. (1987): *Biochem. J.* 247, 579-587
- 106) SCHERER, N.M.; TORO, M.-J.; ENTMAN, M.L. and
BIRNBAUMER, L. (1987): *Arch. Biochem. Biophys.* 259,
431-440
- 107) RYU, S.M.; CHO, K.S.; LEE, K.-Y., SUH, P.-G. and RHEE, S.G.
(1987): *J. Biol. Chem.* 262, 12511-12518
- 108) IRVINE, R.F.; LETCHER, A.J. and DAWSON, R.M.C. (1984): *Bio-*
chem. J. 218, 177-185
- 109) STUBBS, E.B., Jr.; KELLEHER, J.A. and SUN, G.Y. (1988): *Bio-*
chim. Biophys. Acta 958, 247-254
- 110) DOCTROW, S.R. and LOWENSTEIN, J.M. (1987): *Biochem.*
Pharmacol. 36, 2255-2262
- 111) BROCKERHOFF, H. (1986): *Lipids* 39, 83-92
- 112) LASSING, I. and LINDBERG, U. (1988): *Exp. Cell Res.* 174, 1-15
- 113) USHIRO, H. and COHEN, S. (1980): *J. Biol. Chem.* 255, 8363-
8365
- 114) FARRAR, W.L. and ANDERSON, W.B. (1985): *Nature* 315, 233-
235
- 115) HABENICHT, A.J.R.; GLOMSET, J.A.; KING, W.C.; NIST, C.;
MITCHELL, C.D. and ROSS, R. (1981): *J. Biol. Chem.*
256, 12329-12335

Tabellarischer Lebenslauf

Michael Messer

geboren	: 11. Mai 1961 in Duisburg
Vater	: Karl Messer, Beamter der Berufsfeuerwehr der Stadt Duisburg
Mutter	: Ursula Messer, geb. Marks
Familienstand	: seit dem 14. Febr. 1986 verheiratet mit Andrea Messer, geb. Plenker

Schulausbildung

Sept. 1967 - Juni 1971	: kath. Grundschule an der Musfeldstraße in Duisburg Hochfeld
Aug. 1971 - Mai 1980	: Steinbart - Gymnasium an der Realschulstraße in Duisburg Stadtmitte

Hochschulstudium

Okt. 1980	: Beginn des Studiums der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Okt. 1982	: Diplom - Vorprüfung
Nov. 1985	: Abschluß des Studiums mit dem Diplom
Jan. 1986 - Okt. 1988	: Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung für Biochemie supramolekularer Systeme

